

Tesis de Posgrado

Mecanismo de acción de la hormona luteinizante y esteroidogénesis en células de Leydig

Radicella, Juan Pablo

1986

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Radicella, Juan Pablo. (1986). Mecanismo de acción de la hormona luteinizante y esteroidogénesis en células de Leydig. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1946_Radicella.pdf

Cita tipo Chicago:

Radicella, Juan Pablo. "Mecanismo de acción de la hormona luteinizante y esteroidogénesis en células de Leydig". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1986. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1946_Radicella.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"MECANISMO DE ACCION DE LA HORMONA LUTEINIZANTE Y

ESTEROIDOGENESIS EN CELULAS DE LEYDIG"

Autor: Lic. Juan Pablo Radicella

Director: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo

Instituto de Biología y Medicina Experimental

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

-1986-

Tesis 1946
p. 2

A Maria.
a mis padres,
y a mis hermanos.

Lamento haber dejado sin resolver
tantos problemas. Siempre me veo
obligado a presentar la misma
disculpa, pero el mundo es
realmente desconcertante, y yo no
puedo remediarlo.

Bertrand Russell

Agradezco especialmente:

Al Dr. Juan Carlos Calvo, mi director de tesis, por su dedicación, apoyo y estímulo constantes durante todo este trabajo.

Al Dr. Eduardo Charreau, por todo lo que aprendí de él durante estos años en que me brindó no sólo un lugar en su laboratorio sino guía y consejo permanentes.

Al Lic. Martín Crespi, por haberme enseñado todo lo que sé sobre topoisomerasas y por haber compartido, con su amistad y trabajo, la última etapa de esta tesis.

Al Dr. Omar Pignataro, por su calidez y apoyo desde los primeros trabajos que realicé en el IBYME.

A mis docentes de Química Biológica: Dres. Eduardo Charreau, Carlos Lantos, Juan Carlos Calvo, Marta Tesone, Omar Pignataro y Lic. Lucrecia Piñeiro, por las enseñanzas y la confianza brindadas.

Al Dr. Eduardo Ortí, por su amistad y compañía.

Al Dr. Lino Barañao, por sus consejos tanto en lo científico como en lo personal.

Al Dr. Alberto Baldi, por la discusión de los experimentos de topoisomerasa.

A mis demás compañeros de laboratorio: Violeta Chiauzzi, Ana Rosa de la Cámara, Ruth Ladenheim, Tomás Santa Coloma y Julio Simón y Marta Tesone, por su cálida colaboración.

A todo el personal del IBYME y a todos aquellos que de algún modo contribuyeron para que esta tesis pudiera concretarse.

A mis padres y mis hermanos que siempre me apoyaron y estimularon.

A María, mi mujer, por todo lo que me brinda día a día.

INDICE

INTRODUCCION

Consideraciones generales	1
Unión de la hormona a su receptor testicular	
Interacción de los receptores con la adenilato ciclasa: AMPc como segundo mensajero	9
Quinasas y fosforilación de proteínas en la acción del AMPc	13
Síntesis de proteínas relacionadas con la esteroidogénesis	17
Internalización del complejo hormona - receptor	18
Regulación homóloga de los receptores para LH: internalización y desensibilización	22
Resensibilización testicular y poblaciones celulares	28
Acción de las hormonas peptídicas a nivel genómico	30
Topoisomerasas de tipo I	34

OBJETIVOS	38
-----------	----

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación	40
Obtención y purificación de las células de Leydig	41
Separación de las distintas poblaciones de células de Leydig	42
Marcación de proteínas con ^{125}I	43
Experimentos de unión de oPr1	45
Determinación de los sitios receptores para LH	47

Separación de la hormona unida a membrana celular	49
Determinación de la ¹²⁵ I-LH degradada	49
Respuesta testicular "in vivo" a la administración de hCG	50
Estimulación "in vitro" de testículos enteros con hCG	50
Incubaciones con células de Leydig purificadas	51
Determinaciones de esteroides	52
Determinación de la concentración de AMPc	54
Determinación de la unión de AMPc a sus receptores intracelulares	54
Preparación de extracto nucleares y solubles	55
Preparación de extractos totales	59
Ensayo de topoisomerasa I	60
Preincubaciones de los extractos totales	61
Otras determinaciones	62

RESULTADOS

I-Medición de la actividad específica de hormonas marcadas	64
Descripción y aplicación del método	64
Comprobación experimental	68
II-Parámetros de la unión de LH a los receptores testiculares	77
III-Resensibilización testicular	
Estudios sobre los efectos de una y dos inyecciones de hCG	87
Receptores para hCG y respuesta "in vitro" de los testículos de ratas tratadas	90
Estudio de la resensibilización en las	

distintas poblaciones de células de Levdiq	101
Papel del AMPc en el estado resensibilizado	112
IV-Procesamiento de la LH y respuesta celular	121
Estudios cinéticos de la internalización y la degradación	123
Internalización y respuesta celular	139
V-Efectos nucleares de la LH	146
Caracterización de la topoisomerasa I de células de Levdiq	146
Efectos de la gonadotrofina sobre la actividad de topoisomerasa I de distintas fracciones subcelulares	154
Efecto del AMPc sobre la actividad de topoisomerasa I	161
DISCUSION	165
REFERENCIAS	192

ABREVIATURAS

LH	hormona luteinizante
hCG	gonadotropina coriónica humana
AC	adenilato ciclasa
AMPc	adenosina 2',3' monofosfato cíclico
GTP	guanósina trifosfato
ATP	adenosina trifosfato
PK	quinasa de proteínas
UI	unidades internacionales
db-AMPc	dibutiril AMPc
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
HMG	proteínas de alta movilidad
PBS	buffer fosfato salino
M199	medio 199
u	micro
cpm	cuentas por minuto
Ci	Curie
MIX	metil-isobutil-xantina
BSA	albúmina de suero bovino
DTT	ditiotreitól
PEG	polietilenglicol
SDS	dodecil sulfato de sodio
B	hormona unida
F	hormona libre
Q	número de sitios totales
AE	actividad específica

INTRODUCCION

Consideraciones generales

El surgimiento y la evolución de los organismos multicelulares se basó en la habilidad de las células eucarióticas para expresar su información genética de diversos modos y para funcionar en forma cooperativa, como un solo organismo. Una de las adquisiciones más antiguas fue probablemente la de los epitelios, en los que las células se unieron para formar capas, separando el espacio interno del exterior. Además de las células epiteliales pueden haber aparecido, entre las células diferenciadas primitivamente, las nerviosas, las musculares y las conectivas.

En el desarrollo de los animales superiores, las mismas estrategias evolutivas se utilizaron para producir un mayor número de tipos celulares especializados y métodos de coordinación más sofisticados. Claros ejemplos de esto son el sistema inmune de los vertebrados, el sistema nervioso y los sistemas hormonales.

La coordinación entre las distintas células de un organismo multicelular requiere la comunicación entre ellas. Esta comunicación se precisa para el desarrollo y la organización de los tejidos, para el control del crecimiento y la división y para la coordinación de sus diversas actividades. La importancia y la complejidad de la comunicación intercelular en los animales superiores sugieren que una gran proporción de los genes de estos organismos están involucrados en dichos procesos.

Se puede considerar que las células se comunican esencialmente a través de tres mecanismos: a) forman uniones en hendidura que comunican directamente los citoplasmas; b) tienen moléculas unidas a la membrana que influyen sobre las células adyacentes; y c) secretan sustancias químicas que actúan sobre células alejadas.

Este último mecanismo indirecto presenta a su vez tres modalidades; 1) la mayoría de las células de un organismo secreta señales químicas que funcionan como mediadores locales, rápidamente captados y destruidos; 2) las células endócrinas secretan hormonas que viajan por la sangre para actuar sobre células ampliamente distribuidas en el cuerpo;

y 3) las células nerviosas forman sinapsis con las células blanco y secretan mediadores químicos de muy corto alcance, denominados neurotransmisores, que sólo actúan sobre la célula adyacente.

Las células nerviosas y las endócrinas están altamente especializadas y trabajan en forma coordinada para regular las distintas actividades de millones de células de un animal. Las células nerviosas transmiten la información mucho más rápidamente que las endócrinas porque no dependen de factores como la difusión o el flujo sanguíneo para llevar la información. La señal nerviosa es conducida velozmente por impulsos eléctricos. Solamente con la liberación de un neurotransmisor, en una terminal nerviosa, los impulsos eléctricos se transforman en una señal química; entonces, el neurotransmisor sólo debe difundir a través de distancias microscópicas para alcanzar la célula blanco. En cambio las hormonas se diluyen muchísimo en el torrente sanguíneo y por lo tanto deben ser capaces de actuar en muy bajas concentraciones (menores que 10^{-8} M). Los neurotransmisores se diluyen muy poco y alcanzan concentraciones relativamente altas (10^{-4} M) en las inmediaciones de la célula blanco.

Para el control de la función gonadal, los sistemas endócrino y nervioso están física y funcionalmente unidos por una región específica del cerebro denominada hipotálamo. Este órgano se ubica por encima de la hipófisis, a la que está unida por el tallo pituitario. La función de intermediario que ejerce el hipotálamo entre ambos sistemas la desarrollan células que tienen propiedades mixtas. En ellas se dan procesos nerviosos, transmitiendo impulsos eléctricos pero también liberan señales químicas a la sangre. Cada una de estas células neurosecretoras puede ser estimulada por otras regiones del cerebro para liberar una hormona peptídica específica a los vasos sanguíneos del tallo pituitario. La hormona entonces modula específicamente la secreción de una segunda hormona por la glándula pituitaria. Muchas de estas hormonas hipofisarias, también proteicas, regulan a su vez el funcionamiento de otras glándulas endócrinas. Un ejemplo típico lo constituye la hormona luteinizante (LH) que es una glicoproteína cuya secreción por la hipófisis anterior está regulada por la hormona liberadora de gonadotrofinas de origen hipotalámico, y en el macho, estimula la producción de andrógenos (esteroides sexuales masculinos)

por el testículo.

Las hormonas hipofisarias, así como muchos neurotransmisores, drogas y toxinas, inician sus acciones a través de interacciones específicas con moléculas complementarias. El concepto de "receptor" tiene su origen en el estudio de toxinas celulares. A comienzos de este siglo, los trabajos sobre los efectos del curare y la nicotina llevaron a Langley (1) a postular la existencia de una "sustancia receptiva" en las células. Paralelamente, las investigaciones de Ehrlich (2) sobre la toxina del tétanos y la acción antimicrobiana de algunos colorantes lo llevaron a formular el concepto de receptor. Los trabajos de Clark (3,4), relacionados con la atropina y la acetilcolina, revelaron que los receptores para estas sustancias estaban presentes en muy pequeñas cantidades y muy probablemente sobre la membrana celular.

La mayoría de las señales químicas afectan a sus células blanco alterando las propiedades o la velocidad de síntesis de proteínas preexistentes o iniciando la producción de nuevas. En las distintas células la misma señal suele modificar distintas proteínas y por lo tanto

tener distintas respuestas. Esto no puede explicarse siempre por diferencias en los receptores. En muchos casos la misma molécula se une a receptores proteicos idénticos y, sin embargo, produce respuestas muy diferentes.

Sutherland y sus colegas (5,6) propusieron a la membrana celular como el sitio de acción de las hormonas peptídicas, basados en observaciones que incluían el hallazgo de que la interacción de catecolaminas con la membrana plasmática de los eritrocitos producía la activación de la adenilato ciclasa. Desde entonces, se ha demostrado que la mayoría de las hormonas peptídicas son capaces de producir una importante gama de respuestas biológicas uniéndose a sus receptores de membrana. El desafío actual consiste en develar los complejísimos mecanismos que traducen el reconocimiento inicial de un ligando en una respuesta celular determinada. En esta tesis se utilizó como modelo para el estudio de la acción hormonal la hormona luteinizante y sus efectos sobre las células de Leydig del testículo. El resto de esta introducción pretende sintetizar el desarrollo de los conocimientos actuales sobre el mecanismo de acción de la LH en las células de Leydig y algunos aspectos

relacionados.

Unión de la hormona a su receptor testicular

La elucidación del modo de acción de las hormonas en sus células blanco requiere un conocimiento preciso de la localización celular de los sitios receptores a los cuales se une inicialmente el ligando. Los estudios realizados "in vivo" (7,8) e "in vitro" (9,10) con hormonas marcadas con iodo radiactivo demostraron que entre las células intersticiales del testículo, las células de Leydig, son capaces de captar preferencialmente LH o gonadotrofina coriónica humana (hCG). Algunos de estos experimentos fueron realizados en dispersiones de células intersticiales, que retienen tanto la capacidad de unir la hormona como la de biosintetizar testosterona a partir de precursores radiactivos (11,12).

Los receptores gonadales para LH o hCG fueron localizados en la fracción de membranas (13) y pudieron ser solubilizados con detergentes (14). Estos receptores en células de Leydig se identificaron como glicoproteínas asimétricas de peso molecular de 190.000 daltons, con un

componente fosfolipídico minoritario (15), han sido purificados hasta casi homogeneidad y parecen estar compuestos por dos subunidades de 90.000 daltons (16). Estos datos, obtenidos por técnicas de fraccionamiento y cromatografía de afinidad, han sido confirmados por estudios más recientes mediante el entrecruzamiento covalente de la hormona con el receptor (17) y la marcación "in vitro" de los receptores para LH con [³⁵S]-metionina (18). La capacidad de unión de LH de los testículos de ratas adultas es aproximadamente de 1 pmol/g lo que equivale a unos 20.000 sitios por célula de Leydig (19).

Los receptores de LH en células intersticiales del testículo han sido visualizados por varias técnicas como inmunofluorescencia (20), autorradiografía de hCG marcada con ferritina, con técnicas indirectas de inmunoferritina (21) y localización de ¹²⁵I-hCG (21,22). Estos métodos demostraron una ubicación predominante de los complejos hormona receptor en la superficie celular, concordante con resultados previos de estudios de fraccionamiento subcelular.

Interacción de los receptores con la adenilato ciclasa: AMPC como segundo mensajero

Es conocido que la respuesta fundamental del testículo a la gonadotrofina es la estimulación de la producción y la secreción de testosterona (23). Sin embargo, antes de la respuesta esteroidogénica, el primer efecto de la LH en la función de las células de Leydig consiste en la activación de la adenilato ciclasa (AC) y por lo tanto la síntesis de AMPC (24,25). Los niveles de AMPC se incrementan a los pocos segundos de la interacción hormona receptor, mientras que el aumento en la secreción de testosterona recién es evidente después de 5 - 10 minutos (26). Por otro lado la respuesta esteroidogénica de las células de Leydig puede ser reproducida por análogos del AMPC (27) y la sensibilidad de la respuesta androgénica a la gonadotrofina es aumentada por la acción de inhibidores de las fosfodiesterasas (28), enzimas responsables de la hidrólisis del nucleótido cíclico. Estas observaciones son consistentes con un papel del AMPC como intermediario intracelular de la activación esteroidogénica por gonadotrofinas.

Varios experimentos posteriores confirmaron al AMPc como segundo mensajero en la estimulación por LH de la esteroidogénesis testicular. Dufau y colaboradores (29) probaron que la curva dosis respuesta para la ocupación de sitios intracelulares para AMPc (provenientes de la subunidad regulatoria de la quinasa proteica dependiente de AMPc) se superponía a la de producción de testosterona. Muchos de los efectos de la LH podían lograrse mediante la estimulación con toxina de cólera (30) o con forskolina (31) siendo estas dos sustancias activadores inespecíficos de la AC. La producción de AMPc y testosterona, estimulada por adrenocorticotrofina en híbridos de células de Leydig y de adrenal (32), es una prueba más del papel del nucleótido en la activación de la esteroidogénesis. El GMPc, en cambio, no actúa como segundo mensajero en las acciones de la LH sobre el testículo (33).

La hipótesis del receptor móvil, que ha sido propuesta como un mecanismo por el cual la AC es modulada dentro de la membrana celular por la interacción con el receptor, se basa en la suposición que el receptor y la enzima son moléculas distintas y aisladas. Se propuso que la ocupación del receptor por la hormona aumenta la afinidad

del receptor por otros componentes de la membrana, como los involucrados en la activación de la AC. Este modelo en dos etapas es concordante con la posibilidad de que exista difusión lateral de los receptores y las moléculas enzimáticas en la matriz fluida de la membrana plasmática. Esto también explica la activación no aditiva de la AC, en ciertas células, por distintas hormonas y la modulación de procesos de membrana independientes, por una misma hormona.

Si bien los receptores para hormonas parecen estar físicamente diferenciados de la AC, los dos tipos de moléculas poseen una relación íntima en el aspecto funcional. Los estudios de la relación entre la AC y los receptores específicos para hormonas proteicas, en una variedad de condiciones fisiológicas y de desarrollo, han demostrado la cercana correlación entre estas dos actividades. Por ejemplo, la aparición de receptores para gonadotrofinas en el testículo fetal está asociada a la aparición de la respuesta en AMPc y a la capacidad de sintetizar testosterona ante el estímulo hormonal (LH) (34).

Algunos modelos más recientes han descripto una mayor complejidad funcional del sistema de la AC. El sistema tiene por lo menos tres sitios a los que se unen distintos ligandos modificando la actividad enzimática (35,36). Estos sitios son: 1) el receptor para la hormona; 2) el sitio catalítico que reacciona con el complejo Mg-ATP; y 3) un sitio regulatorio intermedio que reacciona con nucleótidos de guanina. Los efectos de estos nucleótidos han sido estudiados en varios tejidos dependientes de hormonas. Análogos sintéticos de GTP, resistentes a la hidrólisis enzimática, son capaces de estimular a la mayoría de los sistemas de AC, sugiriendo un papel de activadores alostéricos para los nucleótidos de guanina. El Gpp(NH)p activa la AC uniéndose al mismo sitio que el GTP. La unión de Gpp(NH)p a las membranas celulares ha sido correlacionada en algunos tejidos con el grado de activación de la AC. El modelo actual postula que los receptores de membrana forman complejos oligoméricos con una proteína regulatoria de la membrana (N) e impiden que ésta reaccione con GTP. La hormona, al unirse al receptor, libera la proteína para que se le una el nucleótido y de ese modo pueda interactuar con la subunidad catalítica del

sistema de la AC (37,38).

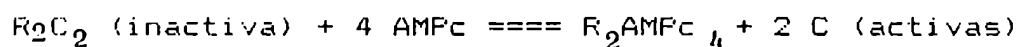
La enzima de la célula de Leydig es casi totalmente dependiente de los nucleótidos de guanina para responder a las gonadotrofinas (39). La estimulación de la AC es amplificada por la presencia de Gpp(NH)p. Por otro lado, existen evidencias en otros sistemas (40,41) de un papel importante de las proteínas capaces de unir GTP en el metabolismo de los fosfoinositoles y sobre todo, en la movilización del ión calcio. Este ión produce, en células de Leydig, un efecto potenciador de la esteroidogénesis estimulada por LH (42), posiblemente a través de un mecanismo en el que interviene la quinasa de proteínas dependiente de calcio y fosfolípidos (43).

Quinasas y fosforilación de proteínas en la acción del AMPc

La capacidad del AMPc de activar una quinasa en el hígado resultó ser un rasgo común de las células eucarióticas, en las que todas las acciones del AMPc parecen estar mediadas por la fosforilación de proteínas. Este mecanismo es iniciado por una quinasa de proteínas (PK) dependiente de AMPc. La PK transfiere el grupo

fosfato en la posición γ del ATP al sustrato proteico.

La especificidad de las respuesta mediadas por AMPc dependen del tipo de PK, y particularmente de los sustratos presentes en cada tipo celular. Se podría esperar que existiera una gran variedad de PK con especificidad para los distintos sustratos. Sin embargo, sólo se han identificado unas pocas formas de la enzima. La mayoría de las PK controladas por hormonas en tejidos blanco dependen de AMPc, y unas pocas de GMPc, calcio o fosfolípidos. Estas PK son estimuladas por concentraciones micromolares de los nucleótidos y responden casi instantáneamente al aumento en los niveles del nucleótido cíclico disparada por la hormona. La PK dependiente de AMPc en su forma inactiva es un tetrámero compuesto por dos tipos de subunidades, una capaz de unir AMPc y la otra con actividad catalítica. Hay en cada tetrámero dos subunidades regulatorias (R) y dos catalíticas (C). Cuando el AMPc se une a las regulatorias (2 moléculas de AMPc por cada subunidad) se liberan las catalíticas en su forma activa:



La subunidad catalítica es probablemente común a todas las formas de PK dependientes de AMPc, mientras que las regulatorias muestran diferencias. Las formas solubles de la PK dependiente de AMPc pueden ser separadas en dos clases utilizando columnas de intercambio iónico. La PK de tipo I es menos ácida, puede ser fácilmente eluida por sustrato o NaCl 0,5 M y se reasocia lentamente después de la activación con AMPc. La de tipo II es más ácida, es eluida lentamente por las histonas y sales pero se reasocia rápidamente para formar el oligómero inactivo. Las dos holoenzimas son similares en su composición y peso molecular. Las diferencias se presentan en el peso molecular y la función de las subunidades regulatorias. Las de tipo I unen Mg-ATP, mientras que las de tipo II catalizan la fosforilación de su propia subunidad regulatoria. No está claro aún el significado funcional de estas diferencias. Ambos tipos de PK dependientes de AMPc fosforilan de modo relativamente específico residuos serina en regiones definidas de la estructura primaria de muchas proteínas.

Como se había encontrado en la glándula adrenal y en el ovario con adrenocorticotrofina y LH respectivamente (44,45), la PK dependiente de AMPc es estimulada en células de Leydig por acción de la LH (46). Desde entonces el grupo de Dufau ha caracterizado las quinasas de proteínas existentes en las células intersticiales del testículo (47-50). En estos trabajos se demostró que la quinasa de células de Leydig en columnas de intercambio iónico se comporta como del tipo I pero las demás características son las del tipo II. La enzima presenta en geles de poliacrilamida un doblete de pesos moleculares 54.000 y 56.000 daltons. La unión de AMPc, por otro lado, disminuye en forma dependiente de la hormona utilizada para estimular previamente las células.

Una vez activada, la quinasa produce una cascada de fosforilación de proteínas en células de Leydig intactas (51). Las curvas de aparición de proteínas fosforiladas y de producción de andrógenos en función de la concentración de LH son muy similares (52,53). A los pocos minutos de incubación con ^{32}P aparecen por lo menos cinco proteínas fosforiladas. Una de ellas, de 57.000 daltons de peso molecular, es la subunidad regulatoria de la PK dependiente

de AMPc (54). Otras han sido localizadas en los microsomas y podrían regular la síntesis de otras proteínas de vida media corta que, a su vez, estimularían la actividad mitocondrial de ruptura de la cadena lateral del colesterol (55-57). Una de estas proteínas podría ser la S6 de ribosomas (58). Las demás proteínas que se fosforilan por acción de la LH son proteínas básicas que se encuentran en el núcleo. Pese a estos datos, la naturaleza y la función de la mayoría de estas proteínas no se conoce aún.

Síntesis de proteínas relacionadas con la esteroidogénesis

Se mencionó anteriormente que la síntesis de algunas proteínas estaría involucrada en la estimulación de la producción de testosterona por las células de Leydig. Esta hipótesis está avalada por los efectos provocados por inhibidores de la síntesis de ARN y de proteínas (59-61) sobre la esteroidogénesis estimulada por gonadotrofinas. Es particularmente interesante el efecto de la cicloheximida, ya que provoca una inhibición de la síntesis de testosterona siguiendo una cinética de primer orden con una vida media de 13 minutos (62). Utilizando geles de poliacrilamida se han encontrado varias proteínas que son

inducidas por LH en células de Leydig (63-65). También se encontró una proteína de 33.000 daltons y una vida media de 11 minutos que, si bien no es inducida por la hormona podría ser necesaria para su acción (63). Un trabajo reciente (66) confirmó la estimulación por gonadotrofinas de la síntesis "de novo" de proteínas de vida media corta, necesaria para la producción de esteroides en células de Leydig tumorales. Como en el caso de las fosfoproteínas, no se ha podido aún demostrar la función de estas proteínas en el mecanismo de acción hormonal.

Internalización del complejo hormona receptor

Es conocida la capacidad de las células blanco para responder a cambios en la concentración de ligando mediante la regulación del número de receptores. Esta modulación de los sitios se daría a través de un mecanismo de endocitosis de la hormona mediada por el receptor. Sin embargo no es del todo claro el fin para el cual se produce la internalización de la hormona. Las dudas surgen de la localización del complejo hormona receptor asociado al aparato de Golgi o a los lisosomas donde, aparentemente, el ligando es degradado (67-69). Estos hechos sugieren que la

internalización de la hormona podría tener un papel crítico en la regulación de la sensibilidad de las células ante nuevas exposiciones a la hormona (70,71). Si bien el desarrollo del proceso de internalización y degradación es demasiado lento para explicar las respuestas agudas inducidas por la hormona, no se descarta que cambios importantes como el crecimiento celular, la diferenciación celular o la inducción de proteínas estén controlados por estos procesos. Quizás distintas subclases de receptores controlan funciones bioquímicas en diferentes organelas celulares.

Uno de los principales factores que se requieren para la endocitosis mediada por receptor parece ser la movilidad lateral de estas macromoléculas en el plano de la membrana. Con técnicas de fluorescencia se ha demostrado que, a temperaturas fisiológicas, el número de receptores móviles y su velocidad de difusión disminuyen con el tiempo de incubación (72,73). La disminución en la difusión se debería a la formación de agregados que, en última instancia son endocitados (74-76). Si bien los estudios de fluorescencia indican que los receptores, originalmente móviles, son inducidos a agregarse por la unión de ligandos

monovalentes, técnicas más sensibles muestran que, en algunos casos, existe una preagregación de los receptores (76,77). Los experimentos realizados con anticuerpos anti receptor de insulina o de LH (78-80) o con lectinas (81) sugieren que la agregación de los receptores es una condición necesaria, aunque no siempre suficiente, para disparar la respuesta biológica en la célula blanco.

Todos estos procesos de membrana resultan finalmente en una internalización del complejo hormona - receptor via endocitosis. Brown y Goldstein demostraron que los ligandos, en este caso las lipoproteínas, se acumulaban en regiones específicas de la membrana (82). Más de un 50% de la lipoproteína unida a la membrana del fibroblasto se concentraba en un 2% de la superficie celular (83). Estas zonas de la membrana, en muchos casos, tienen como característica que en su lado interno están recubiertas por la proteína clatrina, de donde toman el nombre de "pozos recubiertos". Los pozos recubiertos producen invaginaciones que finalmente se vesiculan para formar las "vesículas recubiertas" (84), que luego pierden la clatrina, posiblemente para ser reciclada a la membrana (85). Se forman así los receptosomas. Otros autores

postulan en cambio que los pozos recubiertos nunca se separan de la membrana, sino que antes de transformarse en receptosomas pierden la clatrina (86).

Esta nueva organela, también denominada endosoma, parece tener como destino su fusión con lisosomas. Además de las evidencias morfológicas (87,88), los efectos de agentes lisosomotrópicos que inhiben la degradación (89-91) sugieren que el ligando internalizado se acumula en los lisosomas. Sin embargo experimentos hechos con insulina y prolactina marcadas demostraron que existe un pasaje previo por el aparato de Golgi donde, en algunos casos se detectó hasta el 90% de la marca (92,93). Cuando se estudió el efecto de la cloroquina en la internalización de

I-insulina se observó un aumento de la radiactividad en la fracción lisosomal pero acompañado de un incremento proporcional en la fracción del Golgi (94). La cloroquina podría tener un efecto en los procesos funcionales de las vesículas que intervienen en la internalización y la degradación de las hormonas proteicas, posiblemente relacionados con las variaciones de pH. Recientemente se ha demostrado que las fracciones de endosomas contienen una bomba protónica dependiente de ATP (95). Esto parece

indicar que durante su tránsito vesicular, el complejo ligando - receptor comenzaría a ser procesado, quizás empezando por una disociación del complejo debida a la acidificación de las vesículas. Este hecho permite plantear la hipótesis de un reciclado de los receptores (96) que se ha demostrado en el caso de la insulina en adipocitos (97) pero que en otros sistemas no se produce (98).

Regulación homóloga de los receptores para LH: internalización y desensibilización

En 1976, varios grupos simultáneamente encontraron que la administración de hCG o LH a ratas machos provoca una disminución en el número de receptores para gonadotrofinas en el testículo (99-102). Diez horas después de una inyección de 500 UI de hCG los receptores para LH en células de Leydig disminuyen a menos del 10% del control y permanece por debajo de ese valor durante 96 horas (100). Esta desaparición no es atribuible a la ocupación de los sitios (103) sino a un fenómeno de "regulación negativa". Sin embargo, previamente a ese descenso en el número de receptores, entre las 3 y las 6 horas después de la

inyección se produce un aumento del número de sitios (102-104) que no depende de la síntesis proteica y se puede reproducir "in vitro" (105). Después de esa etapa se manifiesta la regulación negativa, por la cual la LH (o la hCG) reduce sus receptores de membrana por incremento de la velocidad de internalización (106) y, en algunos casos, por inhibición de la síntesis del receptor (107).

Contemporáneamente al descubrimiento de la regulación negativa de los receptores para LH en testículo, se presentaron evidencias de la internalización de la hormona y su posible degradación en lisosomas como mecanismos de terminación de la acción hormonal en células de Leydig (108,109). Estudios posteriores de Ascoli y Puett, realizados en líneas tumorales de células de Leydig, demostraron que la mayor parte de la hormona marcada que se une a esas células es finalmente degradada y la marca es liberada al medio como 3' - monoiodotirosina (110). Este proceso de degradación es inhibido por agentes lisosomotrópicos como el NH_4Cl , la cloroquina y el Triton WR-1339. También se probó que la degradación de la hormona es un proceso que requiere energía y puede ser inhibido por compuestos que interfieren con la glucólisis o la

fosforilación oxidativa (111). Un trabajo posterior del mismo autor prueba que para que se produzca la degradación de la gonadotrofina ésta debe ser internalizada intacta y que, luego, la degradación afecta a las subunidades individualmente (112). Poco se sabe, en cambio, del mecanismo por el cual llega la hormona al sitio de degradación como de la internalización en sí misma.

Junto con el hallazgo de que una dosis alta de hCG provocaba la pérdida de los receptores testiculares para LH, también se encontró que los testículos de esas ratas tratadas presentaban producciones basales de AMPc y testosterona elevadas. Además estos testículos perdían, durante los 3 ó 4 días posteriores a la inyección, su capacidad para responder produciendo AMPc y testosterona ante la estimulación "in vitro" con gonadotrofina (102). Las respuestas se recuperan a partir del quinto día. Estudios realizados en células de Leydig aisladas demostraron que la respuesta esteroidogénica no podía ser recuperada por la estimulación con db-AMPc ni con toxina de cólera (113,114). Estos datos sugieren que la desensibilización de las células de Leydig producida por gonadotrofinas está relacionada al menos con dos fenómenos:

un bloqueo enzimático distal y una lesión proximal involucrando la concentración de receptores y el acoplamiento a la producción de AMPc. Ascoli demostró que la pérdida de la respuesta no está relacionada con la degradación de la hormona (115). Por otro lado se descubrieron lesiones en el camino esteroidogénico, independientes del número de receptores. La acumulación de progesterona y 17 hidroxiprogesterona en el plasma de los animales tratados y en las células de Leydig de esos animales, después de la incubación "in vitro" con hCG, localizó el bloqueo principal al nivel de la conversión de los 17 α hidroxiesteroideos en andrógenos (116). Posteriormente se demostró en este laboratorio que otra enzima esteroidogénica, regulable por la hormona, la hidroximetilglutarilcoenzima A reductasa, constituía un nuevo punto de lesión, esta vez en el camino biosintético del colesterol (117).

Otras enzimas esteroidogénicas no son afectadas por el tratamiento hormonal. La reducción de la actividad de las enzimas microsomales es acompañada por una disminución en el contenido de citocromo P-450. La dependencia de la 17-hidroxilasa y la 17-20-desmolasa respecto del citocromo

P-450 está indicada además por la constancia de la actividad específica de las enzimas cuando ésta se expresa en función del citocromo (118).

La similitud entre las lesiones producidas por estrógenos y las producidas por hCG, sugieren un papel de los estrógenos endógenos en el desarrollo de los bloqueos enzimáticos presentes en la desensibilización inducida por gonadotrofinas. La estimulación con hCG produce un rápido aumento en los niveles de estradiol testicular que resulta en una traslocación de los receptores citosólicos hacia el núcleo. Por otra parte, el antiestrógeno Tamoxifeno es capaz de impedir las lesiones esteroidogénicas distales durante la desensibilización (119). En células de Leydig en cultivo, se demostró que los estrógenos no están relacionados con las lesiones esteroidogénicas tempranas y que estas lesiones podían también ser producidas por incubaciones con db-AMFc (120,121). En estos mismos trabajos se encontró una proteína de peso molecular 27.000 daltons que aparece 6 horas después del estímulo con LH, cuya síntesis depende de estrógenos y que podría estar relacionada con la regulación del camino biosintético de los andrógenos. Otros autores, en cambio, no encontraron

el efecto de los estrógenos descrito (122) y atribuyen un papel predominante en la desensibilización a los radicales libres (123).

El análisis de la secuencia de los eventos provocados por la acción de dosis desensibilizantes de gonadotrofinas (124), así como los efectos de LH deglicosilada, capaz de inducir la pérdida de los receptores pero no la desensibilización de la célula de Leydig (125), demostraron que la desensibilización no resulta de un evento a nivel del receptor sino de uno previo a la regulación negativa de los sitios. Uno de los puntos afectados podría ser el acoplamiento del receptor con la AC. Pese a que recientemente se ha sugerido que la desensibilización podría deberse a alguna lesión a nivel de un compartimiento del AMPc involucrado en el control de la esteroidogénesis (126), hasta el momento, las evidencias indican que la causa de la insensibilidad en la producción de AMPc estaría en un defecto en la interacción entre el receptor y la proteína regulatoria de la AC (127) o entre esta última proteína y la unidad catalítica (128). En algunos sistemas, no en todos, la síntesis proteica es requerida para que ocurra la desensibilización inducida por la

hormona (129). Ultimamente se ha relacionado el mecanismo de desacoplamiento de la ciclase y el receptor durante la desensibilización con eventos que involucran al citoesqueleto (130-133). Lo interesante de este punto es que abre un panorama sobre el papel de los microtúbulos y microfilamentos en el mecanismo de acción de las hormonas peptídicas (134).

Resensibilización testicular y poblaciones celulares

Uno de los aspectos poco estudiados del proceso de desensibilización testicular es el modo en que las células de Leydig salen de ese estado y el efecto de nuevas exposiciones a la hormona. No hay datos sobre el papel que tendrían estos fenómenos en situaciones clínicas o experimentales en las que se administran grandes dosis de hCG o LH, en algunos casos durante largos períodos, para estimular la producción de testosterona. Se ha visto que un tratamiento crónico con hCG produce una hiperplasia de las células de Leydig (135) pero no se sabe qué efecto tendría una única dosis desensibilizante sobre esas células. La administración de hCG durante largos períodos, en algunas situaciones clínicas como la anorquia bilateral

(136) o el hipogonadismo hipogonadotrófico, produce aumentos en los niveles plasmáticos de testosterona. Dos grupos han demostrado además, que la administración de múltiples dosis de LH, inversamente a lo que ocurre con una única inyección, incrementa la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig (138,139). En nuestro laboratorio (140) se demostró que una segunda dosis de hCG, en vez de inducir un nuevo ciclo de desensibilización, acelera el proceso de resensibilización. En este estado, los receptores para LH no son detectables y, sin embargo, los testículos presentan una respuesta androgénica normal a la estimulación "in vitro" con LH. Un dato interesante es que no hay variaciones detectables en la producción de AMPc por el órgano entero y que, además, se da una reversión de los bloqueos esteroidogénicos.

A partir de todos estos datos se plantean varias opciones: 1) que hubiera un mecanismo de estimulación de la síntesis de andrógenos independiente del AMPc como segundo mensajero; o 2) que existiera una acción selectiva de la gonadotrofina sobre alguna población minoritaria de células de Leydig. Esta última hipótesis se basa en el hallazgo de que, en gradientes de densidad, las células de Leydig se

distribuyen en varias bandas (141-143). Esta heterogeneidad de las células sugirió la posibilidad de la aparición de distintos estadios de un ciclo celular (144). Según el grupo de Payne (142) las tres poblaciones responden de distinto modo a la estimulación con LH o db-AMFc, pese a tener el mismo tipo de receptor. Esta disimilitud en la respuesta podría estar dada por diferencias en las actividades enzimáticas del camino esteroidogénico entre las distintas poblaciones (145). Estas diferencias también se manifiestan en los cambios de distribución, en las poblaciones, de la producción de andrógenos durante la maduración sexual de la rata macho (146). Es interesante notar que el mismo grupo encontró efectos diferenciales de una única o de varias administraciones de gonadotrofina sobre la respuesta esteroidogénica y las enzimas relacionadas en las distintas poblaciones celulares (138,147,148).

Acción de las hormonas peptídicas a nivel genómico

Se mencionó más arriba que la síntesis de proteínas es necesaria para la estimulación de la esteroidogénesis en células de Levdia. Inclusive, se ha demostrado (121) que

ciertas proteínas son específicamente inducidas por las gonadotropinas. Es comunmente aceptado que el AMPc puede actuar como mediador intracelular de varias hormonas y, por ende, como regulador de la expresión de genes en eucariotes. Un efecto directo del AMPc a nivel de la transcripción se encontró para varios genes como el de la prolactina (149,150), la fosfoenolpiruvato quinasa (151), la láctico deshidrogenasa (152) y, posiblemente, el de la tirosina hidroxilasa (153). En algunos casos se ha comprobado que estos efectos son mediados por la PK dependiente de AMPc (154).

Durante bastante tiempo se pensó que los efectos del AMPc eran siempre mediados por mecanismos de fosforilación. Desde los trabajos de Langan (155) en los que se demostró que el glucagon y el AMPc estimulan la incorporación de fósforo a la histona H1, se ha difundido la hipótesis de que el AMPc puede mediar los efectos hormonales sobre la transcripción estimulando la fosforilación de proteínas nucleares. Esto se ha visto reforzado por numerosos trabajos que han demostrado la traslocación de la PK dependiente de AMPc y su presencia en el núcleo (156-159). Sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado ninguna

relación causal directa entre la regulación de la síntesis de ARNm y las fosforilaciones o desfosforilaciones dependientes de AMPc. Cuatro son los modos propuestos por los cuales la fosforilación de proteínas nucleares afectaría la transcripción : 1) la fosforilación de proteínas regulatorias específicas capaces de unirse al ADN activaría (o reprimiría) selectivamente algunos genes; 2) la fosforilación de las ARN polimerasas u otros elementos de la maquinaria de transcripción podría aumentar las velocidades de iniciación o elongación; 3) la fosforilación de proteínas estructurales (H1, H3, HMG 14 ó 17) podría alterar la conformación del nucleosoma de modo de facilitar la transcripción; y finalmente 4) la fosforilación podría alterar la actividad de enzimas que afectan las modificaciones covalentes de proteínas de la cromatina o del ADN.

No existen aún evidencias directas de la regulación por AMPc de la fosforilación de ARN polimerasas u otras enzimas nucleares. Nada se sabe tampoco sobre los efectos que podría tener sobre la cromatina la fosforilación de proteínas como la HMG 14, aunque se ha demostrado que esta proteína se une a zonas de la cromatina

transcripcionalmente activas (160). Por otro lado se conoce que la fosforilación de algunas histonas afecta la afinidad de su unión a otros componentes de la cromatina (161). Recientemente Murdoch y colaboradores han demostrado que en una misma célula el AMPc es capaz de regular la transcripción de genes por dos mecanismos moleculares distintos (162). El AMPc estimula la transcripción del gen de la hormona de crecimiento y la fosforilación de una proteína nuclear de 19.000 daltons, lo que parecería reflejar acciones nucleares directas de la PK dependiente de AMPc. En cambio, la estimulación por AMPc de la transcripción del gen de la prolactina parece ser consecuencia de eventos dependientes de calcio, quizás a través de otras quinasas.

Algunas observaciones recientes llevan a considerar una vía alternativa, análoga a la presente en bacterias, por la cual el AMPc regula la expresión de genes sin que medie la fosforilación proteica. El complejo formado por AMPc y la subunidad regulatoria de la PK de tipo II puede ser un candidato para esa función (163,164). Por un lado se ha informado que la subunidad regulatoria de la PK de tipo II es capaz de traslocarse al núcleo (158,165). Por

el otro, se han encontrado homologies entre la región de unión a AMPc de la CAP (proteína que une AMPc en bacterias) y la de la subunidad regulatoria de tipo II (166): además la secuencia de aminoácidos de esta subunidad tiene algunas características similares a la de las proteínas capaces de unirse al ADN (167). Esto plantea que la disociación de la PK por AMPc podría activar dos procesos: 1) la fosforilación de proteínas por la subunidad catalítica y 2) la regulación de la transcripción por la subunidad regulatoria.

Topoisomerasas de tipo I

Uno de los candidatos para actuar como blanco nuclear de las hormonas son las topoisomerasas. Estas enzimas son las encargadas de controlar y modificar el estado topológico del ADN. Al cortar transitoriamente una cadena del ADN y pasar la otra a través del corte (topoisomerasas de tipo I) o al cortar ambas cadenas y pasar otro segmento doble cadena (topoisomerasas de tipo II), estas enzimas pueden catalizar numerosas interconversiones entre isómeros topológicos del ADN (topoisómeros).

La enzima de tipo I fue hallada originalmente en *E. coli* (168) y poco después en células eucarióticas (169). Dado que estas enzimas no requerían cofactores de alta energía (ATP o NAD) se postuló que la enzima, al cortar el ADN forma simultáneamente un intermediario covalente ADN - enzima. La ruptura transitoria del ADN permite cambios en el número de superhélices. La disociación de la enzima del ADN está acompañada por el cierre del corte. Actualmente se han descrito actividades de topoisomerasa I en una gran variedad de tejidos (170-175), de algunos de los cuales ya ha sido purificada la enzima (175). Esta presenta un peso molecular que oscila alrededor de los 100.000 daltons aunque existen algunas de más de 200.000 daltons. En su mayoría son activas en presencia de Mg^{++} y de quelantes, aunque se obtiene actividad habiendo Mg^{++} en el medio (176,177), inclusive es estimulada por este ión en algunos casos (178). Las enzimas eucarióticas pueden relajar ADN superenrollado tanto positiva como negativamente (169,176,177).

La mayor parte de la actividad de topoisomerasa I en células eucarióticas está localizada en el núcleo, aunque se han informado actividades en mitocondrias (179) y en

cloroplastos. Estudios de inmunofluorescencia en glándulas salivales de *Drosophila* indican que la enzima está asociada a los sitios transcripcionalmente activos. Ya en 1966 se sugirió el requerimiento de un "desenroscamiento" del ADN para la transcripción, de modo que la rotación de un segmento de ADN alrededor de su eje se llevaría a cabo en lugar de una rotación del ARN naciente (180). Varias evidencias indirectas sugieren que, especialmente en células eucarióticas, la topoisomerasa I podría estar involucrada en la transcripción.

Las primeras evidencias en ese sentido se originaron en la presencia de una actividad relajante de ADN en un complejo viral (181) que también contiene otras enzimas necesarias para la transcripción y en nucleolos amplificados de ovocitos de *Xenopus* (182) donde no se detecta actividad de replicación pero es muy activa la transcripción del ADN ribosomal por la ARN polimerasa I.

En trabajos más recientes (183,184) se ha encontrado que en los extremos 3' de ciertos cortes provocados por detergentes en el ADN de *Tetrahymena thermophila* se hallan proteínas unidas covalentemente. Esto sugiere la acción de

una topoisomerasa de tipo I. Además, los cortes se ubican cerca de los sitios hipersensibles al ataque con ADNasa pancreática I. Dada la correlación entre estos sitios y posibles sitios de regulación de la transcripción (185-187), la presencia de topoisomerasa I sugiere una intervención de esta enzima en la misma. Por otro lado, la pérdida del fenotipo transcripcional en levaduras con mutaciones que las hacen deficientes en topoisomerasa I o II (188,189) indican la necesidad de alguna de estas enzimas durante la transcripción.

Es posible que una fracción del ADN intracelular o algunas regiones del cromosoma estén en un estado de superenrollamiento negativo por encima o debajo del número de superhelicidad correspondiente a la formación del nucleosoma. Por lo tanto el estado de superenrollamiento puede afectar la expresión genómica (190).

Todos estos datos hacen que se pueda considerar a la topoisomerasa I como un factor importante en la regulación de la expresión de genes y por lo tanto un candidato para ser blanco de las acciones hormonales.

OBJETIVOS

Son muchos los aspectos conocidos sobre el mecanismo de acción de las hormonas peptídicas en las células blanco. Sin embargo existen varias etapas en este mecanismo que no han sido aún descifradas. En nuestro laboratorio se ha utilizado como modelo, para profundizar en estos aspectos, la acción de la LH sobre las células intersticiales del testículo. Lo interesante de este modelo, aparte de su importancia en el sistema de reproducción de los mamíferos, es que la gonadotrofina produce dos tipos de efectos en las células de Leydig. Por un lado estimula en forma aguda la producción de andrógenos, fundamentalmente testosterona. Por otra parte es responsable del mantenimiento celular, ejerciendo un efecto trófico sobre el tejido.

En este trabajo se encararon varios aspectos del mecanismo de acción de la LH en células de Leydig, relacionados tanto con la respuesta esteroidogénica como con la trófica. Los objetivos propuestos fueron:

1) Estudio fisicoquímico de la unión de la hormona a sus receptores de membranas.

2) Análisis de la resensibilización de las células de Leydig. Se buscó caracterizar este fenómeno, completando los estudios iniciados en nuestro laboratorio. Entre los interrogantes abiertos figuran el papel del AMPc y los efectos sobre distintos tipos celulares, en la respuesta a nuevas estimulaciones.

3) Investigar los mecanismos de internalización y degradación de la LH y su relación con la respuesta esteroidogénica. En este punto se incluyen los estudios sobre la función del citoesqueleto en el procesamiento de la hormona.

4) Finalmente, se estudiarán los efectos nucleares de la acción hormonal. Se enfocará este punto hacia el estudio de la modulación de la actividad de topoisomerasa I como posible blanco de la acción de la LH en el testículo.

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación

Todos los estudios fueron realizados con ratas machos, cepa Wistar, criadas en nuestro instituto. La edad estuvo siempre entre los 55 y los 80 días. Los animales fueron mantenidos en ambiente con temperatura constante e iluminación controlada y alimentados con nutrimento Purina y agua "ad libitum".

Los tratamientos con gonadotrofina se realizaron por inyección subcutánea de 200 UI de hCG (Endocorion, Elea, Bs. As.), disueltas en 0.2 ml de buffer fosfato Dulbecco (PBS). A los animales controles se les administró un volumen igual de PBS.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, y en los casos en que fue necesario se recolectó la sangre y el suero se guardó a -20°C para la determinación de los niveles de testosterona.

Obtención y purificación de las células de Leydig

Se utilizó para la dispersión del tejido tubular del testículo la técnica descrita por Mendelson y col. (28). Los testículos descapsulados, colocados en tubos de plástico (Falcon) (hasta 6 testículos por tubo), fueron suspendidos en M199 (Difco) en una relación de 1 testículo por ml de medio conteniendo 0.3 mg/ml de colagenasa (Worthington). La incubación se realizó a 35°C. durante 15 minutos en un incubador metabólico con agitación constante (180 rpm). Finalizada la incubación, la reacción se detuvo por dilución con M199 (8 ml por ml de incubación). Con el objeto de dispersar mejor el tejido, se agitó en forma rotatoria el tubo, durante 3 minutos, dejándolo reposar otros 3 minutos. Cuando los túbulos hubieron decantado, el sobrenadante fue aspirado con una jeringa de plástico y filtrado a través de una malla de nylon (Nitex), recojiéndose el líquido filtrado en otro tubo de plástico. La resuspensión se repitió una vez más y el líquido filtrado se juntó con el anterior. Este filtrado, conteniendo células intersticiales impurificadas, se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos.

Para eliminar los glóbulos rojos presentes en este preparado. las células se resuspendieron en 4 ml de una solución Tris-HCl 1.7 mM pH 7.2, NH_4Cl 140 mM (191) y se incubó la mezcla durante 10 minutos a 35°C con agitación constante (100 rpm). La lisis se detuvo por dilución (40 ml) con FBS. Las células se recuperaron por centrifugación a $700 \times g$ durante 10 minutos.

Finalmente las células de Leydig se purificaron por centrifugación ($3.300 \times g$, 10 minutos) a través de 8 ml de una solución de Metrizamida (Nvegaard) al 11% . El precipitado así obtenido estaba compuesto por un 95 - 98% de células de Leydig determinadas por la técnica histoquímica para la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (192).

Separación de las distintas poblaciones de células de Leydig

Para separar las distintas poblaciones celulares se utilizó el método descrito por Conn y col. (19). A partir de una solución de Metrizamida en M199, 80% (p/v). se prepararon soluciones de las siguientes concentraciones:

32, 20, 15 y 11% colocando 5, 10, 5 y 10 ml de cada una, respectivamente, en tubos de plástico de 50 ml de capacidad. Las células, resuspendidas en 5 ml de M199 después de la lisis de glóbulos rojos, fueron colocadas en la parte superior del gradiente y los tubos fueron centrifugados a 3.300 g durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall. Finalizada la centrifugación, se individualizaron 4 bandas de células, denominadas O, IA, IB y II (en orden de densidad creciente) de acuerdo con lo encontrado por Payne y col. (142).

Se tomó cada una de las bandas con pipeta de plástico, se pasaron a distintos tubos, se diluyeron con M199 (20 ml) y se centrifugaron a 1.000 x g durante 10 minutos. El lavado se repitió una vez más.

Marcação de proteínas con ^{125}I

Las hormonas peptídicas (hCG; hLH y oPr1) fueron marcadas con Na^{125}I (New England Nuclear NEZ-033A) (libre de portador, 17 Ci/mg), a temperatura ambiente, utilizando la técnica de lactoperoxidasa de Thorell & Johansson (193), excepto que la reacción se realizó a pH 7.4 durante 2

minutos. La primera purificación de la hormona marcada se realizó a través de una columna (0.5 cm x 20 cm) de Sephadex G-75, equilibrada con buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7.5 conteniendo 0.2% de albúmina de suero bovino (BSA) (Sioma, fracción V), NaCl 100 mM y azida sódica 0.05% . Cuando se requirió una LH marcada de mayor pureza se la recromatografió en una columna de tamizaje molecular ACA 54 (Ultrodel, LKB) de 64 cm de largo y 1.3 cm de diámetro. La columna se mantuvo siempre en un cuarto frío (6°C). Como eluyente se utilizó un buffer fosfato, BSA 0.1%, pH 7.4. Se juntaron fracciones de 0.6 ml que luego se contaron en un contador de centelleo sólido. El volumen total de la columna fue 93.5 ml y el V_0 determinado por azul dextrano fue 29.7 ml. Se utilizaron como marcadores de peso molecular la hemoglobina y el citocromo c (PM= 64.000 y 12.300 respectivamente). En este paso se separan 5 picos radiactivos correspondientes a agregados (dímeros y mayores), la hormona, las subunidades y finalmente ^{125}I o ^{125}I -tirosina. El pico correspondiente a la hormona tuvo siempre una MCU entre 25 y 80%, mientras que los demás picos prácticamente no presentaban unión a un preparado testicular de membranas. La determinación de la actividad

específica de las hormonas marcadas se realizó por un método desarrollado en el laboratorio. Los principios y la comprobación de este método se detallan en la sección de resultados.

Experimentos de unión de oPrl

Se homogeneizaron las próstatas ventrales de ratas machos, a 0°C en 4 volúmenes de PBS, pH 7.4 y, luego de filtrar a través de un tejido de nylon, fueron centrifugadas a 27.000 x g en una centrifuga refrigerada, International B20, a 2-4°C durante 30 minutos. El precipitado fue suspendido en 4 volúmenes de PBS y usado para los estudios de unión.

Se realizaron dos tipos de experimentos. En uno, se equilibraron 100 ul de la preparación de membranas con concentraciones diferentes de hormona marcada (entre 15.000 y 400.000 cpm) en un volumen final de 200 ul, a temperatura ambiente durante 20 horas. La unión no específica se determinó en incubaciones paralelas conteniendo 5 ug de prolactina ovina "fría". En el otro tipo de experimento, 100 ul de la preparación de membranas fueron equilibrados

con 50.000 cpm de oPr1 marcada y cantidades diferentes de hormona no marcada (0-20 ng/tubo), en un volumen final de 200 μ l. a temperatura ambiente durante 20 horas. La unión no específica se evaluó en la forma descripta.

Finalizada la incubación, se diluyó la mezcla con 2 ml de PBS frío y se centrifugaron los tubos a 5.000 g, a 2-4°C durante 15 minutos. Los precipitados se lavaron dos veces con el mismo buffer y, luego de centrifugarlos, se determinó la radiactividad remanente en los mismos con un contador gamma automático Beckman Auto-Gamma 4000, con una eficiencia de conteo del 60%.

Con el objeto de obtener la capacidad máxima de unión (MCU) de la preparación de hormona radiactiva, se equilibraron diferentes muestras de la preparación de membranas con 30.000 cpm de hormona marcada, obteniéndose la unión no específica tal como se describió. A partir de la ordenada al origen de un gráfico $1/(\text{radiactividad unida en forma específica})$ versus $1/(\text{volumen de receptor agregado})$ es posible determinar la fracción de hormona marcada que se uniría a una concentración infinita de aceptor (MCU).

Determinación de los sitios receptores para LH

Los testículos descapsulados fueron homogeneizados en 1 ml de MgCl_2 4 M (103) ó 4 ml de PBS según se requiriera determinar los sitios totales o los disponibles, respectivamente. En el primer caso, después de la homogeneización, la preparación fue diluida 15 veces con buffer Dulbecco y centrifugada a $20.000 \times g$ durante 15 minutos en una centrífuga refrigerada. En el segundo caso se pasó a la etapa de centrifugación directamente. El precipitado fue resuspendido en PBS y recentrifugado en las mismas condiciones. El precipitado así obtenido, fue resuspendido en 4 ml de buffer y utilizado como fuente de receptores.

Alícuotas de 100 μl de la fracción receptora fueron incubadas con 50 μl de ^{125}I -hCG ó ^{125}I -hLH (200.000 cpm; AE = 10-30 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), durante 16 horas a 23°C ó 2 horas a 35°C . La unión no específica se determinó por agregado de 100 UI de hCG (Endocorion). Después de la incubación, se agregaron 2 ml de buffer frío y los tubos se centrifugaron a $1.500 \times g$ durante 10 minutos. Los precipitados fueron

lavados una vez y la radiactividad se determinó en los precipitados remanentes. luego de la aspiración del sobrenadante. La unión específica de la hormona se expresó como fmoles o cpm de hormona unida por testículo o por mg de proteínas.

En otro tipo de experimento los sitios receptores para LH se determinaron directamente sobre las células de Levdig purificadas. Para ello el esquema fue idéntico al descrito en el párrafo anterior salvo que la fracción receptora estaba constituida por células intersticiales en suspensión (100.000 - 400.000 cél.). En este caso los resultados se pueden expresar en sitios por célula.

Para determinar el valor de la constante de afinidad (K_a) se realizaron experimentos de saturación o de competencia como los descritos para la unión de la oPr1 y los datos se analizaron según los métodos de Scatchard (194) o lineal directo (195). Para ello se utilizaron programas de computación para una Hewlett Packard HP86, desarrollados en nuestro laboratorio (196).

Separación de la hormona unida a membrana celular

Para separar la hormona unida a la superficie celular se utilizó el método del tratamiento ácido (105,197) con algunas modificaciones. Una vez realizada la incubación de las células o membranas con la hormona marcada o "fría", se centrifugaron las mezclas y el precipitado se resuspendió en 1 ml de una solución de glicina 50 mM y NaCl 100 mM, pH 3.0. Después de una incubación de 2 minutos en hielo, la reacción se detuvo por agregado de 2 ml de M199 previamente llevado a pH 9.0. Los tubos se centrifugaron a $1.000 \times g$ durante 10 minutos y, luego de aspirado, el sobrenadante se descartó. Según el experimento realizado el precipitado se contó en un contador gamma o se reutilizó como fuente de receptores.

Determinación de la ^{125}I -LH degradada

Para cuantificar la radiactividad correspondiente a los productos de degradación de la hormona marcada, el medio de incubación, libre de células, se contó en un contador de centelleo sólido. Luego, se trató con un volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. La mezcla

se incubó durante 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 3.000 rpm en una centrífuga Sorvall refrigerada. El sobrenadante fue aspirado y descartado; el precipitado se resuspendió en 0.5 ml de NaOH 1 N y se contó. La diferencia entre las dos mediciones corresponde a la radiactividad de los productos de degradación de la hormona (111).

Respuesta testicular "in vivo" a la administración de hCG

Para estos estudios, cada grupo consistió de 6 animales, tres de ellos recibieron vehículo, mientras que los otros tres fueron inyectados con 200 UI de hCG (Endocorion), dos horas antes de ser sacrificados. Se juntó la sangre y en el suero se determinó testosterona.

Estimulación "in vitro" de testículos enteros con hCG

La capacidad esteroidogénica de los testículos de las ratas controles o tratadas con hCG se examinó "in vitro" por estimulación con gonadotrofina. Los testículos fueron extirpados inmediatamente después de que los animales fueran sacrificados, luego descapsulados y colocados en 3 ml de M199, conteniendo 1-metil - 3-isobutil xantina (MIX)

(Aldrich) 0,1 mM y BSA 0,1% . La estimulación máxima producida por gonadotropina se determinó agregando 500 ng de hCG (11.000 UI/mg) o dibutiril AMP cíclico (db-AMPC) (Sioma) 1 mM. Los viales de incubación se colocaron bajo atmósfera de carbógeno (O₂ 95% y CO₂ 5%) y fueron incubados durante 4 horas a 34°C.

El medio de incubación fue decantado a tubos de vidrio y centrifugado a 1.500 x g durante 10 minutos. El sobrenadante fue aspirado y guardado a -20°C hasta la medición de testosterona, progesterona y 17 α hidroxiprogesterona. Para la determinación de AMPC, se tomó una alícuota de 0,5 ml antes de congelar el resto y se la hirvió durante 10 minutos. Luego de centrifugar, el sobrenadante se guardó congelado.

Incubaciones con células de Leydig purificadas

Las células, obtenidas según la técnica ya indicada, se incubaron en un volumen final de 1 ml de M199 (aproximadamente 200.000 células intersticiales en un ensayo tipo) con MIX 0,1 mM, BSA 0,4% y suplementado con distintas hormonas o reactivos según la experiencia a

realizar. Salvo que se indique lo contrario las incubaciones se llevaron a cabo durante 4 horas a 34°C, en un incubador tipo Dubnoff y bajo atmósfera de carbógeno. Finalizada la incubación, los tubos se centrifugaron a 800 x g durante 10 minutos, a 4°C. El líquido sobrenadante se pasó a tubos de vidrio y se hirvió durante 10 minutos. Se centrifugaron luego a 3.000 rpm durante 10 minutos y el medio sobrenadante se guardó a -20°C para la determinación de esteroides y AMPc.

El precipitado celular se utilizó en algunos casos para la determinación de la actividad de unión de las proteínas quinasas siguiendo la técnica que más adelante se detalla.

Determinaciones de esteroides

El dosaje de la testosterona se realizó por radioinmunoensayo sobre una dilución 1:25 de los medios de incubación. Se utilizó un suero anti-hormona, obtenido por inmunización activa de conejos (198). El antisuero se utilizó en una dilución apropiada para ligar el 50% de la hormona marcada usada como trazador (³H-Testosterona, New

England Nuclear NET-387. 40-60 Ci/mmol) (10.000 cpm). El rango de utilidad es de 12.5 a 800 pg de hormona, en un volumen final de 0.5 ml. Se incubó durante 16 horas, 4°C. La hormona libre se separó por agregado de 0.2 ml de una suspensión de carbón (Norit A) - dextrano (T 70) (0.5 - 0.05% p/v) en el buffer de ensayo. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido.

El radioinmunoensayo de progesterona se realizó según la técnica de Abraham y col. (199). La 17 α hidroxiprogesterona se midió con un anticuerpo específico, como lo describieran Nieschlag y col. (200). El anticuerpo contra la 17 α hidroxiprogesterona mostró una reacción cruzada con la progesterona, por esto las muestras de medio de incubación debieron ser extraídas previamente y cromatografiadas en placas de alúmina usando como solvente de desarrollo cloroformo : éter (80 : 20). Se usó un patrón interno tritiado, para corregir por pérdidas durante la purificación.

La testosterona sérica se determinó después de dos extracciones con 5 ml de éter etílico (Merck). El residuo remanente después de la evaporación de los extractos

etéreos se resuspendió en 0.5 ml de buffer de reacción. Para la determinación por radioinmunoensayo de testosterona se toma una alícuota adecuada de esta solución.

El tratamiento de los datos de los radioinmunoensayos, así como los de las determinaciones de AMPc, fue hecho con un programa de computadora desarrollado en colaboración con el Dr. Orti.

Determinación de la concentración de AMPc

El AMPc fue determinado en los medios de incubación, previamente hervidos, según el método de Brown y col. (228), sin modificaciones. La curva patrón se utilizó entre 0,06 y 40 pmoles de AMPc (Sigma).

Determinación de la unión de AMPc a sus receptores intracelulares

El precipitado celular, obtenido luego de la incubación de las células intersticiales, se lavó con 1 ml de M199, conteniendo MIX 0,1 mM. El precipitado se resuspendió en 1 ml de buffer TMM (Tris-HCl 20 mM pH 7,4 MIX 0,1 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM). Esta suspensión

celular se sonicó durante 15 segundos en la posición 7 de un sonicador Brinkmann. El homogenato sonificado se mantuvo a 0°C y se usó como fuente de quinasa de proteínas. La mezcla de incubación contenía 50 ug de proteínas, 1 uCi de ^3H -AMFp (New England Nuclear, 40 Ci/mmol) en 200 ul de buffer fosfato de potasio 80 mM pH 6,5, conteniendo acetato de magnesio 10 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM y MIX 0,1 mM. Para calcular la unión específica se agregó además en otra serie de tubos AMFp 1 uM. La incubación se efectuó a 6°C durante 2 horas, para determinar los sitios libres. Una vez finalizada la incubación, se agregaron 2 ml de TMM y se filtró a través de un Millipore (0,45 u). El tubo se lavó dos veces con 2 ml de TMM, y luego, con 2 ml del mismo buffer se lavó el filtro. El filtro se dejó secar y se contó la radiactividad unida usando tolueno centellante, en un contador de centelleo líquido.

Preparación de extractos nucleares y solubles

Un esquema simplificado del procedimiento de obtención de extractos de células de Leydig se observa en la figura 1. Las células de Leydig purificadas como se mencionó anteriormente se lisaron en una solución hipotónica de

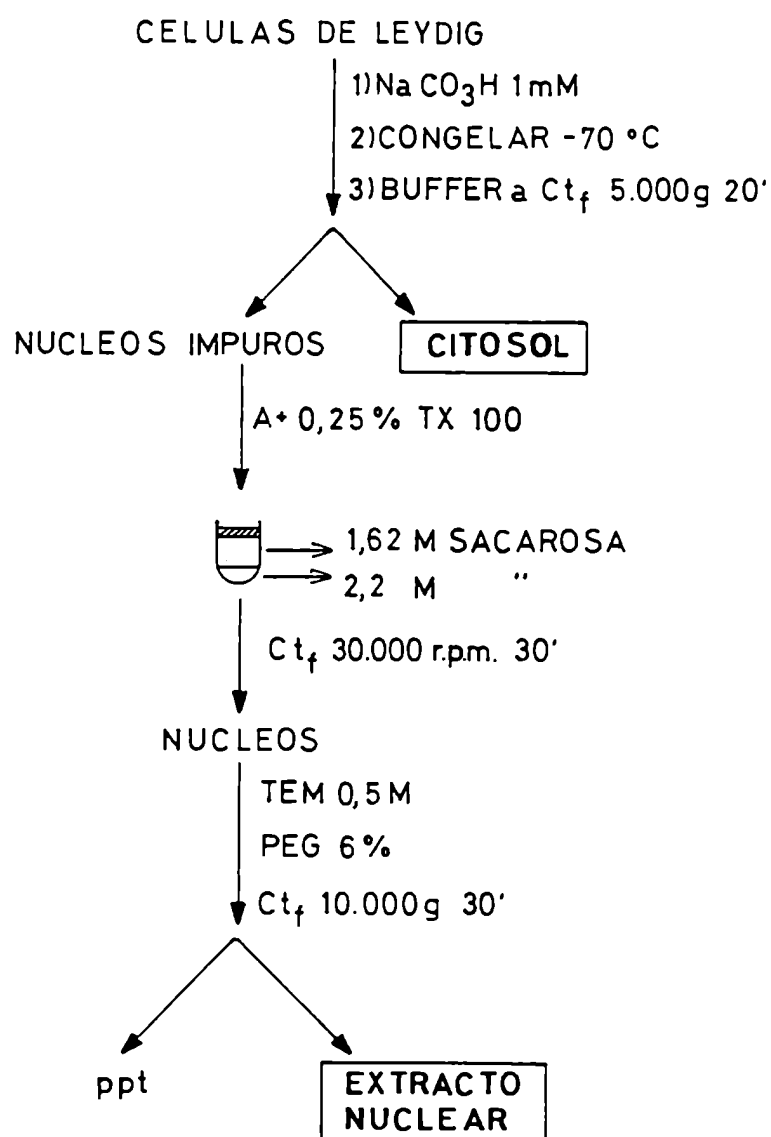


Figura 1: Esquema de obtención de extractos celulares.

bicarbonato 1 mM. $MgCl_2$ 0.2 mM y ditioneitol (DTT) 0.5 mM. Para completar la ruptura celular la suspensión se congeló a $-70^{\circ}C$ durante 10 minutos. Después de descongelar los tubos se les agregó 2 volúmenes de buffer TKM (Tris-HCl 20 mM pH 7.5; KCl 20 mM; $MgCl_2$ 5 mM; DTT 1 mM y el inhibidor de proteasas fluoruro de metil fenil sulfonilo (FMSF) 1 mM) y se llevó a 0.25 M en sacarosa. La relación Mg/K utilizada en este buffer permite estabilizar las membranas nucleares, impidiendo una hidratación brusca de la cromatina. La mezcla se homogeneizó en un Ultraturrax (2 x 15 seg) y luego se centrifugó a 5.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se rotuló como citosol, se le agregó glicerol hasta alcanzar una concentración de 30% v/v y se guardó a $-20^{\circ}C$.

Para la purificación de los núcleos a partir del precipitado proveniente del paso anterior se procedió según lo descrito por Aquilano y Dufau (201) con algunas variantes. El preparado de núcleos impuros se resuspendió en TKM que contenía sacarosa 0.25 M y 0.25% de Tritón X100. La mezcla se homogeneizó y se sembró sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (2.2 y 1.62 M) en TKM. El gradiente se centrifugó a 124.000 x g durante 30 minutos en

un rotor Beckman SW 56 (31.500 rpm). Después de aspirar y descartar el sobrenadante, el precipitado se lavó en TKM 0.15 M en NaCl y se verificó la pureza de los núcleos observándolos en un microscopio de contraste de fases.

Las proteínas nucleares se extrajeron mediante la homogeneización de los núcleos con una jeringa de plástico de 1 ml en un buffer TEM (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; DTT 1 mM; PMSF 1mM; EDTA 1 mM y distintas concentraciones de NaCl). Cuando no se indique lo contrario las extracciones se realizaron en NaCl 0.5 M (TEM 0.5), fuerza iónica necesaria para extraer las proteínas unidas débilmente a la cromatina. Se dejó la mezcla en hielo durante una hora y luego se le agregó polietilenglicol (PEG 8000) hasta una concentración de 6% v/v, para precipitar la cromatina. Después de otros 30 minutos a 0°C se centrifugó a 15.000 x g durante 15 minutos y el sobrenadante se llevó al 30% en glicerol. El extracto nuclear se guardó a -20°C.

Todos los pasos de obtención de extractos se realizaron manteniendo la temperatura entre 0 y 4°C.

En otros casos, a partir de los núcleos puros se hizo un primer extracto con TEM 0.5 tal como se describiera en los párrafos anteriores. Luego, el precipitado de cromatina se resuspendió en TEM 1 (1 M en NaCl) y se extraio mediante el procedimiento ya descripto.

Preparación de extractos totales

Las células de Leydig purificadas y lavadas dos veces con PBS frío se resuspendieron en buffer TKM y se homogeneizaron por pasaje a través de una jeringa de plástico de 1 ml (80 veces). Una vez comprobada la lisis celular por observación al microscopio de contraste de fases, se procedió a aumentar la fuerza iónica hasta 0.5 M en NaCl por agregado de un volumen de TEM 1. La mezcla se volvió a homogeneizar (40 veces, por jeringa) y se dejó a 0°C durante una hora para permitir la extracción de las proteínas laxamente unidas a la cromatina. Después de la extracción, se agregó PEG hasta una concentración final del 6% y luego de permitir la precipitación de los ácidos nucleicos se centrifugó a 15.000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se llevó al 30% en glicerol y se lo denominó extracto total. Este extracto se conservó a -20°C

hasta la realización de los experimentos.

Ensayo de topoisomerasa I

La relajación del plásmido pBR 322 (obtenido en el laboratorio del Dr. Baldi utilizando el método descrito por Maniatis y col. (202)) se llevó a cabo en 10 μ l de una mezcla que contenía: Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 0,2 M; DTT 1 mM; BSA 30 μ g/ml; EDTA 1 mM; 1 μ g de plásmido superenrollado y cantidades variables de proteínas provenientes de los distintos extractos. Después de la incubación a 34°C (durante 30 minutos en un ensayo tipo) la reacción se detuvo por el agregado de 2 μ l de una solución que contenía: dodecil sulfato de sodio (SDS) 6%; glicerol 60% y azul de bromofenol 0,05%.

Para determinar el grado de relajación del ADN la mezcla se sembró en un gel horizontal de agarosa 1%. El buffer de corrida estuvo compuesto por Tris-acetato 20 mM pH 8,0 y EDTA 1 mM. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente, durante 14 horas con una diferencia de potencial de 3 volts/cm. Al final de la corrida el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0,0002%

v. para su análisis. se iluminó con luz ultra violeta. Las fotografías se tomaron con película Kodak Tri X de 400 ASA utilizando un filtro rojo.

Se definió una unidad de topoisomerasa I como la cantidad de enzima capaz de relajar un 50% (0,5 uq) del plásmido superenrollado pBR 322 en 30 minutos a 34°C. La actividad de topoisomerasa I se cuantificó según el método de las curvas de dilución descrito por Martin y colaboradores (203).

Preincubaciones de los extractos totales

Los extractos totales de células de *Levdiq* (3 - 8 uq de proteínas) se preincubaron en presencia o en ausencia de AMPc 1 mM durante 20 minutos a 34°C. La mezcla de incubación tenía además Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 5 mM y ATP 2 mM. Después de la preincubación se ajustaron las condiciones para la determinación de la actividad de topoisomerasa I tal como se describió en la sección anterior.

Otras determinaciones

Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry (204) salvo en los extractos preparados para la medición de topoisomerasa en los que se utilizó el método de Bradford (205). Esto se debe, por un lado a la mayor sensibilidad de este último método y por el otro a la interferencia que produce el PEG con los reactivos del método de Lowry. En ambos casos se utilizó BSA como patrón.

Las células de Leydig se contaron en una cámara cuenta glóbulos de Neubauer. Se utilizaron para ello dos técnicas de tinción: una específica para células de Leydig (192) y la otra con azul de metileno. En la primera la mezcla de tinción estuvo compuesta por:

100 μ l de dehidroepiandrosterona (5 mg/ml en propilenolico)

100 μ l de Endocorion (1.000 UI/ml en PBS)

400 μ l de p - nitro - azul de tetrazolio (4 mg/ml en PBS)

200 μ l de β -NAD (16 mg/ml en PBS)

400 ul de suspensión celular (agregados al final).

Esta mezcla se incuba a 34°C durante 3 horas. Las células teñidas de azul se consideran células de Leydig.

La tinción con azul de metileno requiere de la siguiente mezcla de reacción: 50 ul de la suspensión celular + 150 ul de azul de metileno (2% en agua). Esta mezcla se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y luego se diluye con 300 ul de M199. Finalmente se cuentan las células.

RESULTADOS

I-Medición de la actividad específica de hormonas marcadas

Se presenta aquí una técnica simple y útil para obtener las actividades específicas de las hormonas marcadas radiactivamente, con una descripción detallada de los principios matemáticos involucrados y de la comprobación experimental del método.

Descripción y aplicación del método

Cuando solamente está presente un único tipo de sitios de unión, se puede escribir la siguiente ecuación (194):

$$B/F = K (Q - B)$$

donde B es la hormona unida, F la libre, K es la constante de afinidad y Q es el número total de sitios receptores.

El análisis de la unión de un ligando radiactivo a sus receptores puede ser realizado variando la concentración de hormona marcada (saturación), o por un estudio de competición donde una cantidad constante de ligando

radiactivo es mezclada con concentraciones diferentes del mismo reactivo, no marcado. Se pueden entonces obtener dos gráficos: B/F versus radiactividad total (cpm) agregada a la mezcla de incubación y B/F versus cantidad (ng) de hormona "fría" agregada, respectivamente. Si el sistema receptor es el mismo en ambos casos, es decir si se aplican la misma K_a y el mismo Q (cosa que es siempre cierta cuando se utiliza la misma preparación de receptor o anticuerpo y ambos experimentos son realizados simultáneamente y en las mismas condiciones) y las hormonas radiactiva y "fría" presentan igual comportamiento frente al receptor, luego, para un valor determinado de B/F la masa de hormona unida al receptor debe ser la misma en ambos casos. La ecuación que refleja esta situación es:

$$(B_1/T_1) \cdot p_1^* = (B_2/T_2) \cdot (p_2^* + p) \quad [1]$$

donde, para el primer experimento, B_1 es la radiactividad unida en forma específica, T_1 es (radiactividad total - radiactividad no específica) MCU y p_1^* es la masa de hormona radiactiva correspondiente a T_1 . B_2 , T_2 y p_2^* son los mismos parámetros correspondientes al segundo experimento y p es la masa de hormona "fría" agregada.

En la ecuación [1], $p1*/T1$ y $p2*/T2$ son iguales a la inversa de la actividad específica (AE) de la hormona marcada, en términos de cpm/ng. Así:

$$(B1/AE) = (B2/AE) + (B2.p)/T2 \quad [2]$$

De la ecuación [2]:

$$AE = (B1 - B2)T2/B2.p = (B1.T2 - B2.T2)/B2.p \quad [3]$$

La suposición original era que:

$$B1/F1 = B2/F2$$

donde F1 es la cantidad de hormona libre ($T1 - B1$) y F2 es $T2 - B2$.

Luego:

$$B1/(T1 - B1) = B2/(T2 - B2) \quad [4]$$

Reordenando la ecuación [4]:

$$B1(T2 - B2) = B2(T1 - B1) \quad [5]$$

$$B1T2 - B1B2 = B2T1 - B2B1 \quad [6]$$

$$B1T2 = B2T1 \quad [7]$$

Reemplazando [7] en la ecuación [3]:

$$AE = (B2T1 - B2T2)/B2.p = B2(T1 - T2)/B2.p$$

Luego:

$$AE = (T_1 - T_2)/p \quad [8]$$

La ecuación [8] indica que la actividad específica puede obtenerse de los gráficos antes mencionados, a igualdad de valores para B/F y que es necesario descontar la radiactividad total usada como trazador cuando la hormona "fría" es la variable.

Un valor más confiable de la actividad específica se obtiene de la siguiente manera. De la ecuación [8]:

$$AE = T_2/p_2^* = (T_1 - T_2)/p$$

Reordenando la ecuación [8]:

$$T_1 = T_2 + (T_2/p_2^*).p \quad [9]$$

Esta es la ecuación de una línea recta cuyas variables son T_1 y p . Por otra parte, la ordenada al origen es T_2 , o sea el total del trazador marcado usado en el experimento de competencia, y la pendiente es la actividad específica de la preparación de hormona radiactiva. Realizando un gráfico T_1 versus p , para diferentes valores de B/F, uno puede obtener una línea recta usando una regresión lineal simple, y de allí calcular el valor de la actividad

específica del ligando radiactivo.

Comprobación experimental

La figura 2 muestra el perfil de purificación obtenido luego de la marcación de prolactina ovina con Na^{125}I . La actividad específica de esta preparación hormonal (calculada a partir de la eficacia de la incorporación de ^{125}I a la fracción protéica, 96%, determinada por la integración del gráfico) fue de 32,6 uCi/uq.

La figura 3 muestra el ensayo de autodesplazamiento, donde se varió la oPr1 "fría" o la preparación radiactiva, calculándose la relación B/F en ambos casos. Por razones que se discutirán más adelante, se consideró una MCU del 100%. A partir de estas representaciones y usando un rango de B/F entre 0,08 y 0,045, se obtuvieron los valores de T_1 y p y se graficaron como se muestra en la figura 4. La actividad específica, calculada como la pendiente de este gráfico, fue 33,3 uCi/uq, valor que se encuentra en concordancia con el mencionado de 32,6 uCi/uq.

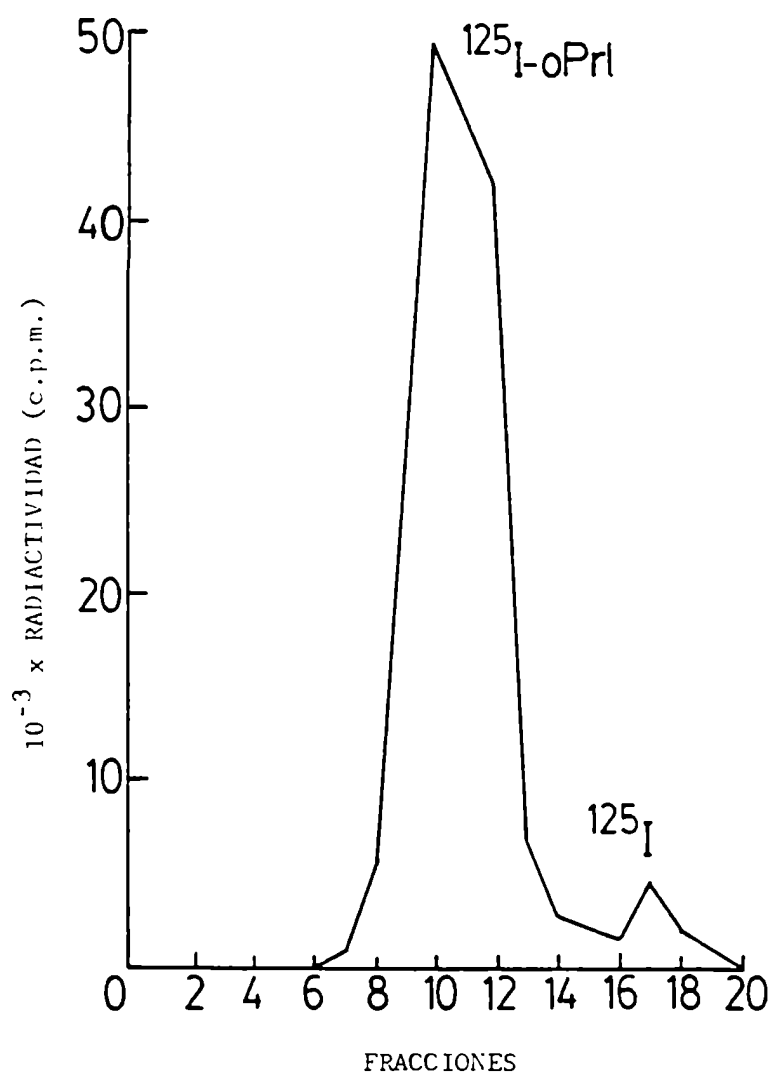


Figura 2: Purificación, a través de una columna de Sephadex G - 75, de prolactina ovina marcada con ^{125}I .

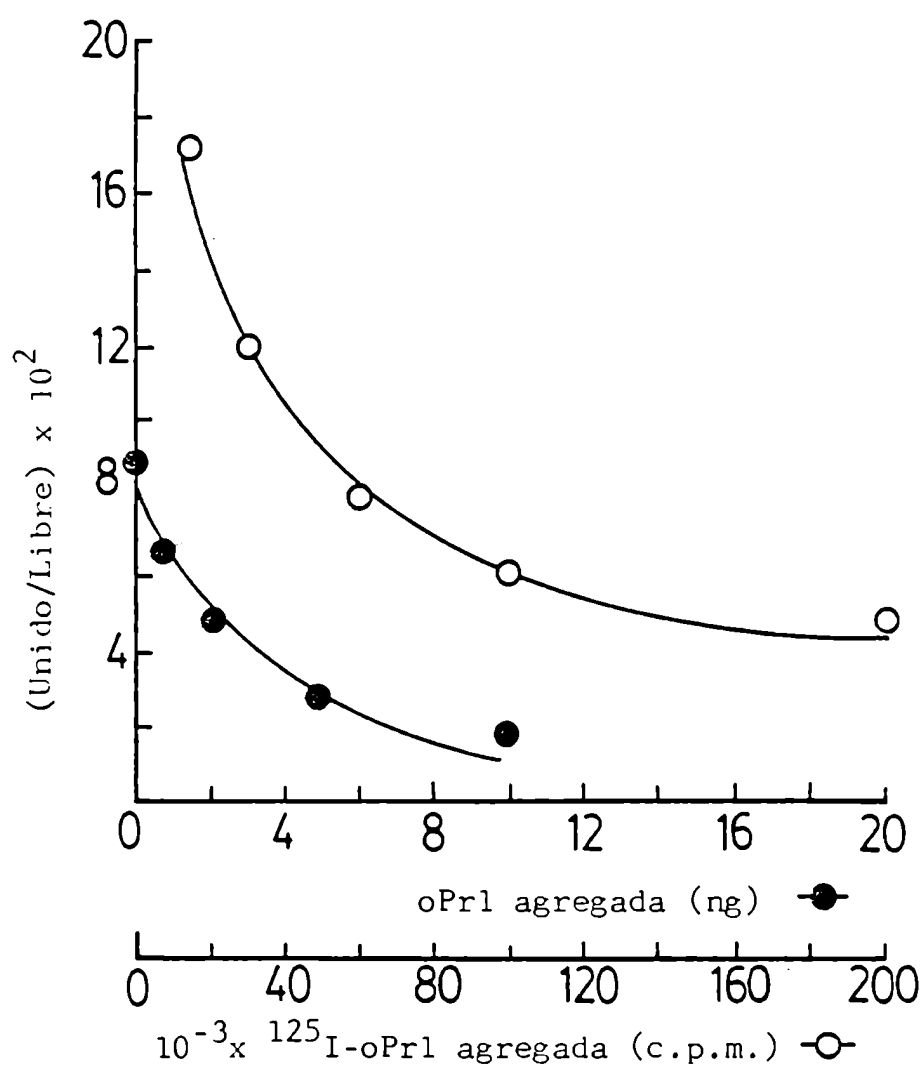


Figura 3: Curvas de desplazamiento obtenidas a partir de experimentos de unión.

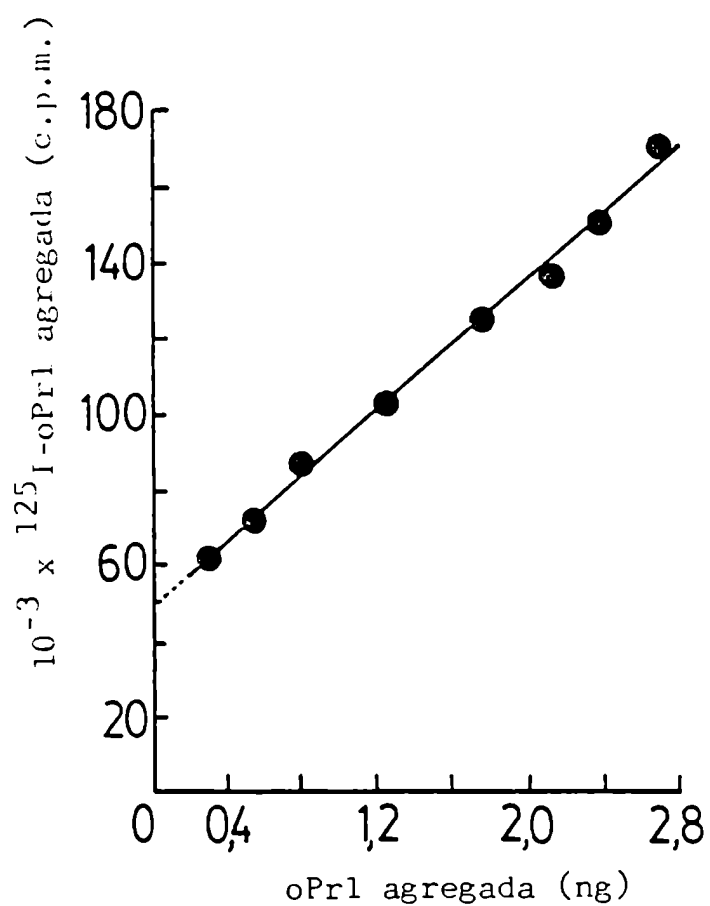


Figura 4: Cálculo de la actividad específica de acuerdo con la ecuación [9].

Pero, como se discutió en la introducción, este no es un valor exacto sino que corresponde a un promedio de especies marcadas con distintas actividades específicas. Con el objeto de obtener una AE más confiable de la hormona capaz de unirse a sus aceptores, se consideró la máxima capacidad de unión de la preparación hormonal. La figura 5 muestra el gráfico de $1/(\text{radiactividad unida})$ versus $1/(\text{volumen de receptor agregado})$, donde la inversa de la ordenada al origen da la MCU (en este caso 64%).

Considerando este valor, se corrigieron los valores de B/F y se los volvió a graficar en función de la cantidad de prolactina no marcada o de la nueva radiactividad total agregada y corregida (figura 6). Usando estos gráficos y la línea recta obtenida a partir de ellos, se calculó una actividad específica de 12,4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

Para observar el efecto de considerar una actividad específica o la otra, se realizaron gráficos según Scatchard (194) (figura 7) utilizando los valores de B/F y los de la radiactividad unida en forma específica del experimento de saturación. Puede observarse que la constante de afinidad en ambos casos es la misma ($5,4 \text{ nM}^{-1}$

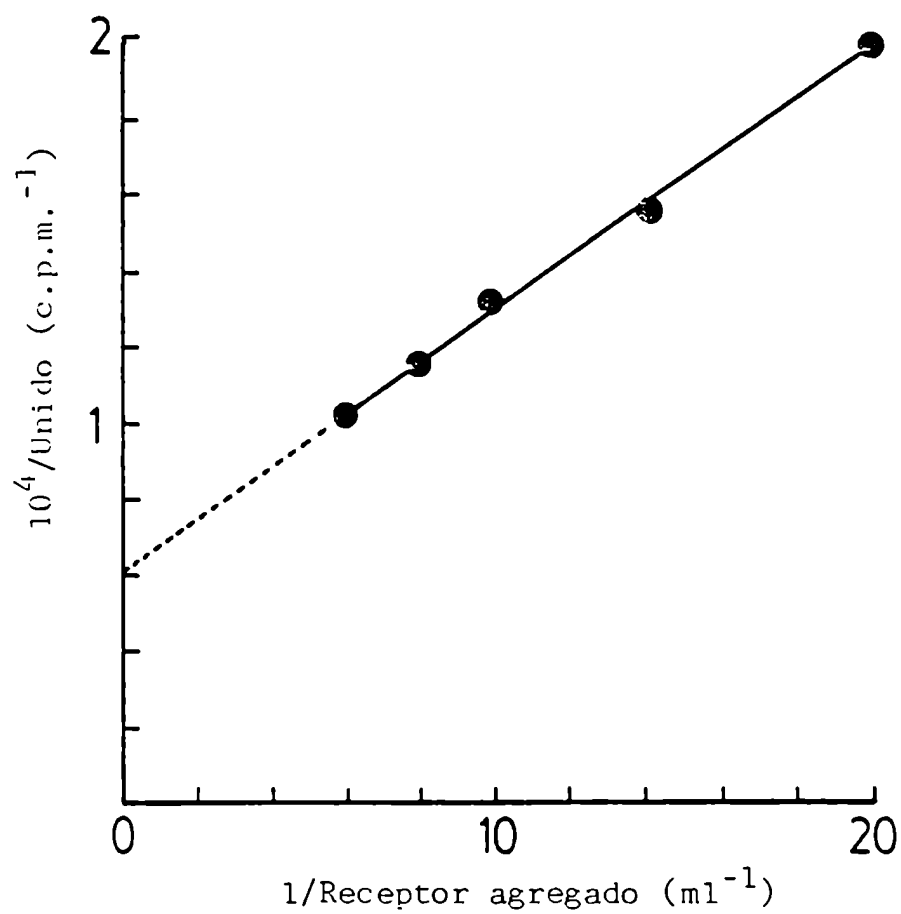


Figura 5: Determinación de la máxima capacidad de unión de la preparación de hormona radiactiva.

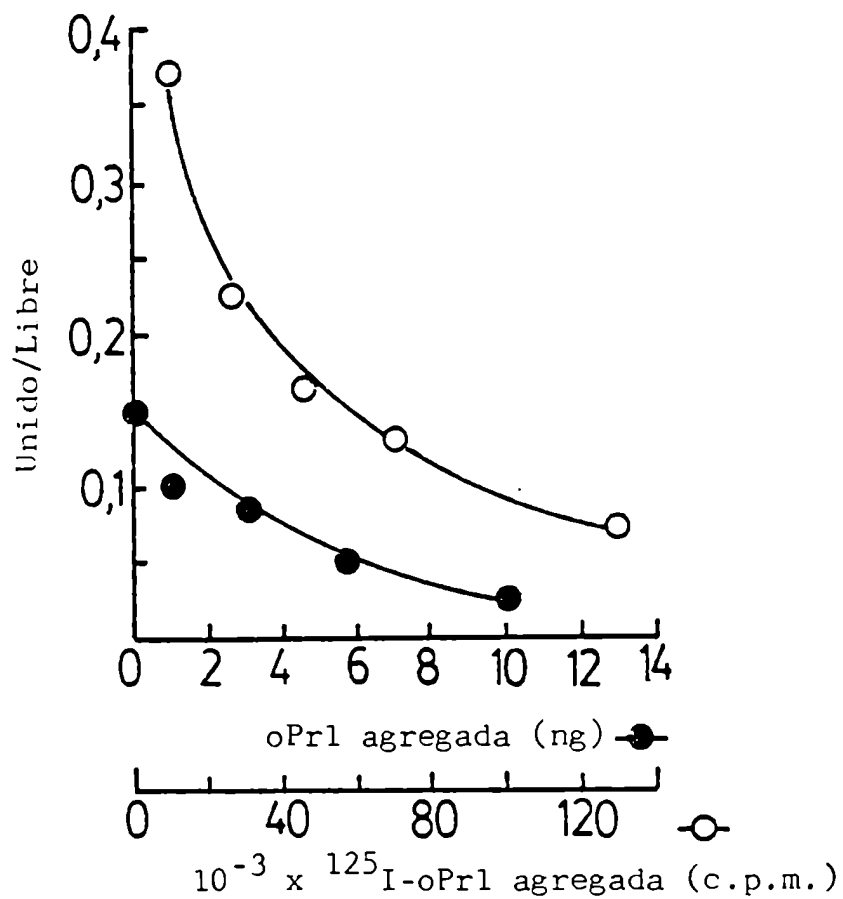


Figura 6: Curvas de desplazamiento obtenidas a partir de los mismos experimentos que en la figura 3, con los datos corregidos por la MCU.

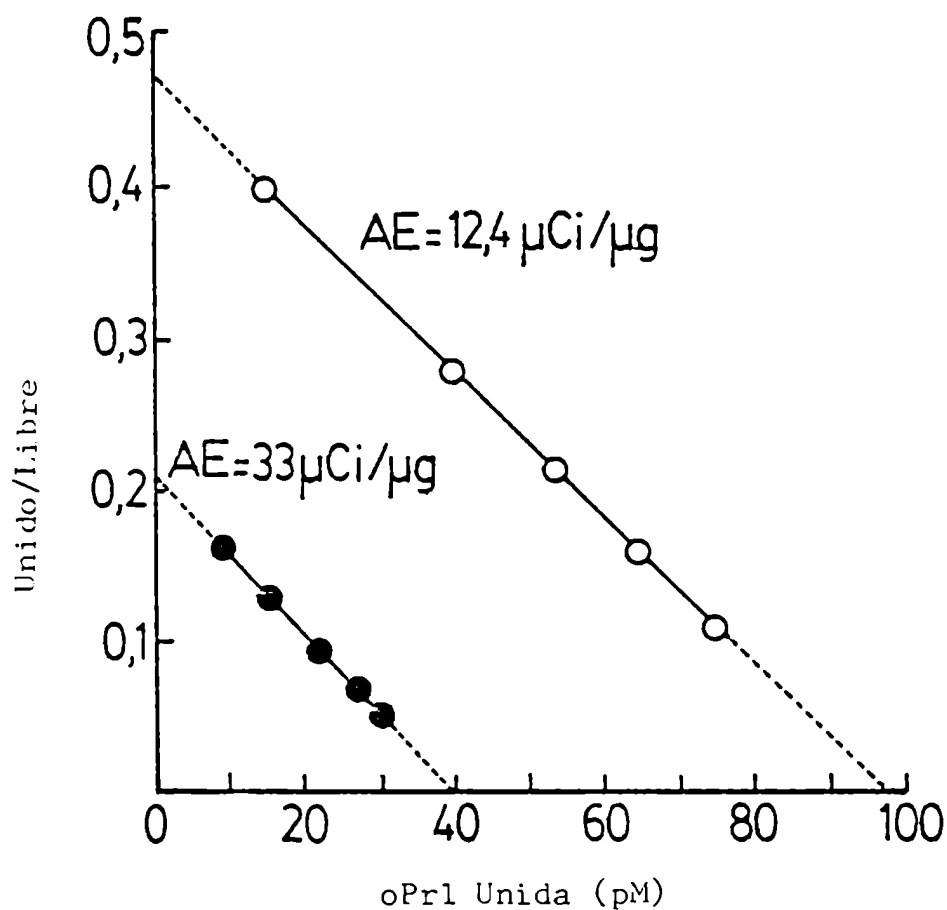


Figura 7: Gráficos de Scatchard obtenidos de los experimentos de unión utilizando las AE calculadas a partir de las fig. 3 y 6.

para una AE de 33.3 uCi/ug y 4,7 nM⁻¹ para una AE de 12.4 uCi/ug). mientras que se produce un aumento significativo en la concentración de sitios receptores (de 39 pM a 97 pM para la menor actividad específica).

Los valores obtenidos para la gonadotropina coriónica humana marcada con ¹²⁵I, usando membranas de testículo de rata como sistema receptor y para ³H-testosterona, usando un anticuerpo específico, fueron los siguientes: para la hCG, la AE determinada por el perfil de elución de la columna cromatográfica, con posterioridad a la marcación, fue de 12,5 uCi/ug, mientras que el resultado obtenido por el método descrito fue de 11,5 uCi/ug. Por otra parte, los resultados para ³H-testosterona fueron: 36,0 Ci/mmol, cuando la AE se calculaba a partir de los datos obtenidos de New England Nuclear, recalculados según el decaimiento radiactivo del tritio y 37,0 Ci/mmol cuando se utilizó la técnica del autodesplazamiento.

II-Parámetros de la unión de la LH a los receptores testiculares

La primera etapa en el estudio del mecanismo de acción de la hormona luteinizante en células de Leydig consistió en el análisis de los parámetros cinéticos y termodinámicos de la unión ligando - receptor.

En la figura 8 pueden verse tres curvas de asociación de ^{125}I -hLH a células de Leydig, en función del tiempo y a tres temperaturas diferentes (8, 26 y 34°C). Estos experimentos se realizaron sobre células enteras en suspensión, permitiendo así que se complete el procesamiento de la hormona por la célula, estableciendo un equilibrio dinámico, similar al existente en el animal. En cada panel se incluyen los datos de hormona unida a la membrana celular y de hormona internalizada. Estos dos parámetros se discernieron mediante el tratamiento de las células con un medio ácido. Este procedimiento despega el 100% de la hormona unida a la membrana celular y no destruye la integridad celular a juzgar por los datos de microscopía óptica, manteniendo la respuesta esteroideogénica (105). Puede verse que tanto a 8 como a 26

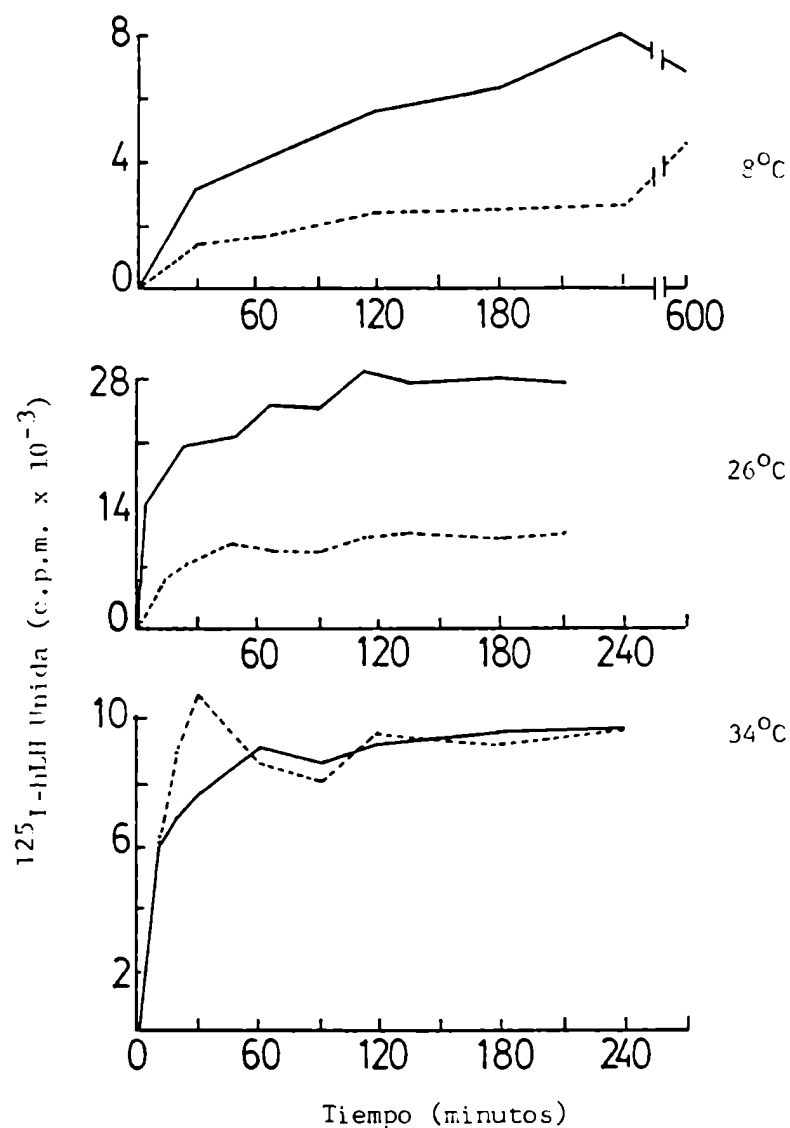
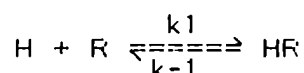


Figura 8: Curvas de asociación de ^{125}I -hLH a células de Leydig. Interior (---); Superficie (—).

y a 34°C se observa el proceso de entrada de la hormona al interior celular.

A partir de estos datos se calcularon las constantes de velocidad de segundo orden para la reacción:



Los valores se calcularon basándose en la hormona unida total (internalizada + superficie + degradada), es decir que representan constantes de asociación aparentes y que deberán ser recalculadas una vez que se conozcan las demás constantes involucradas en el estado estacionario (agrupación, endocitosis, recambio de receptores, transporte, degradación, etc.). Los resultados fueron: para 8°C $k1 = 0.0021 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$; para 26°C $0.0084 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y para 34°C $0.0135 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Estos valores de $k1$, transformados a $\text{M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$, fueron utilizados para realizar un gráfico de Arrhenius, según la siguiente ecuación:

$$k = A.e^{-E/RT}$$

o su expresión logarítmica:

$$\ln k = - \frac{E}{RT} + C$$

La figura 9 muestra el gráfico obtenido donde puede verse la linealidad que existe entre las constantes halladas y $(1/T)$ (con T en grados Kelvin). La energía de activación (E), calculada a partir de la pendiente de este gráfico, resultó ser de 12.410 cal/mol y $A = 1,62 \times 10^{14} \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$.

El término A se denomina "factor de frecuencia" y representa la frecuencia total de encuentros entre dos moléculas reaccionantes. Es evidente que cuanto mayor sea el valor de E menor será el factor $e^{-E/RT}$ y, como para muchas reacciones el factor de frecuencia no varía considerablemente, será la energía de activación la que determine, a menudo, si la reacción es rápida o lenta a una dada temperatura. Una reacción bimolecular con un valor de E de 20.000 cal/mol tendrá una velocidad mensurable a temperaturas ordinarias. El valor obtenido indica que la reacción de asociación entre la hormona y su receptor es una reacción rápida a las temperaturas fisiológicas.

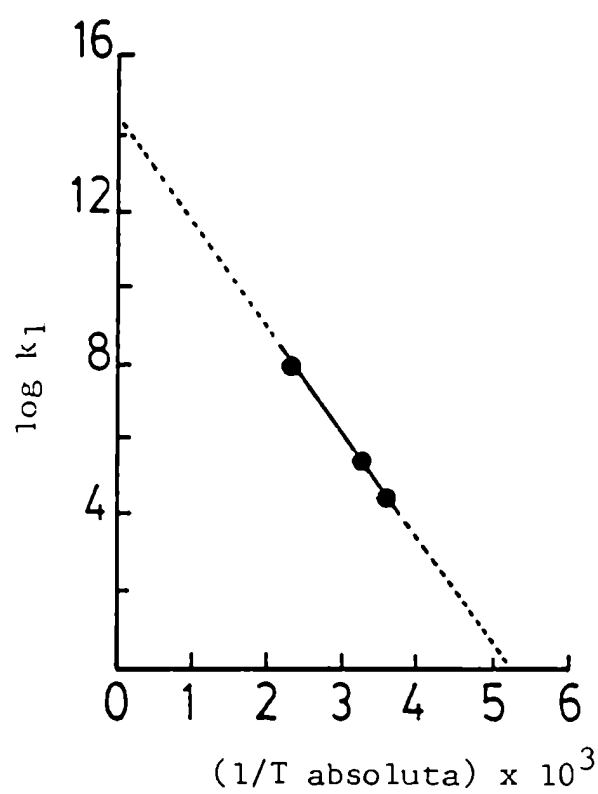


Figura 9: Gráfico de Arrhenius mostrando la relación entre las constantes de velocidad de asociación y la temperatura.

Una vez analizada la asociación de la LH a las células de Leydig, se encaró el estudio de la reacción inversa, la disociación. Para ello, un preparado de membranas de células de Leydig se trató con hormona marcada durante dos horas, luego se lavó, se lo dividió en alícuotas y reincubó a 34°C en presencia o ausencia de un exceso de hCG no marcada. A cada tiempo se determinó por duplicado la cantidad de ^{125}I -hLH unida. La figura 10 presenta el gráfico de disociación del complejo hormona receptor en función del tiempo. A pesar de que este experimento se realizó en membranas de células de Leydig y no en células enteras, los resultados obtenidos muestran una curva de disociación de tipo bifásica, con una primera componente rápida y una segunda de disociación más lenta. Además, dada la superposición de las dos curvas (con y sin hCG) quedaría descartada la posibilidad de que en la unión de la gonadotrofina a sus receptores testiculares se produzca un fenómeno de cooperatividad negativa.

Esta curva de disociación correspondería a una expresión del tipo:

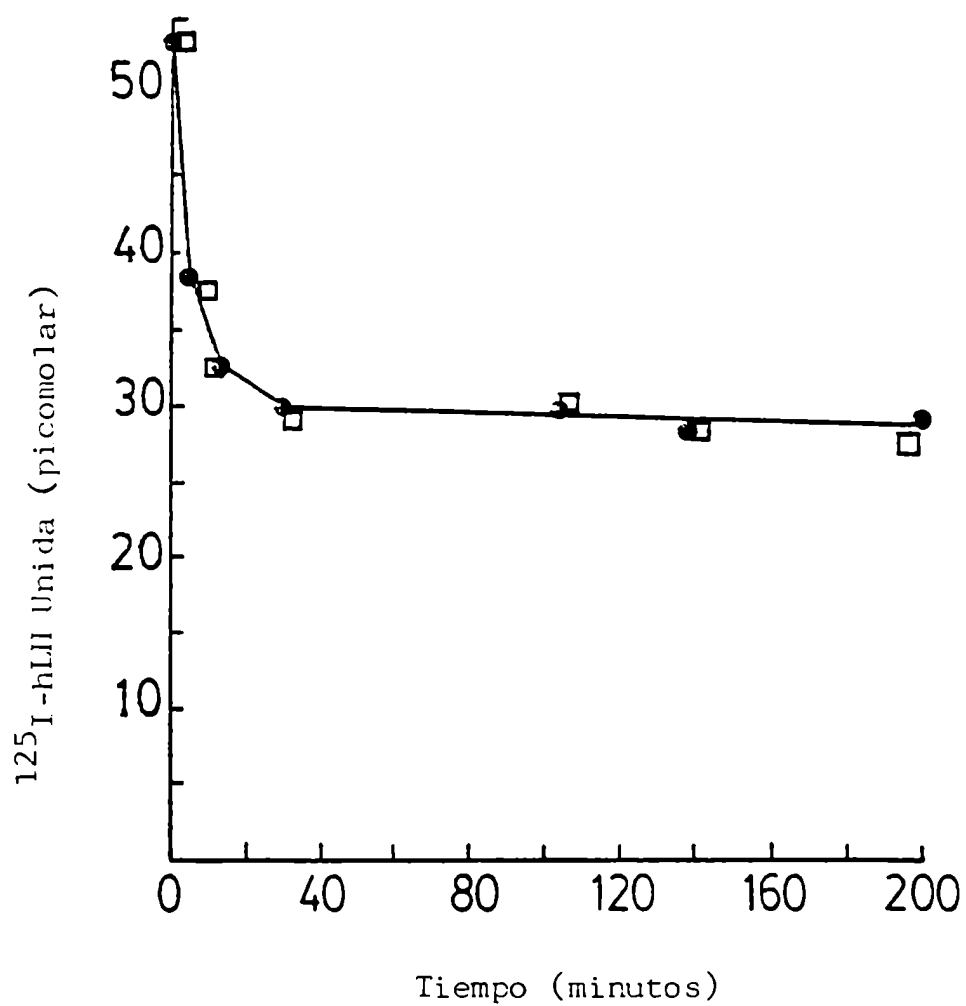


Figura 10: Curvas de disociación para la unión de ^{125}I -hLH a membranas de células de Leydig, en presencia (●) o ausencia (□) de hCG en exceso.

$$B_t = B_1 e^{-k_2 t} + B_2 e^{-k'_2 t}$$

donde B_t es la hormona unida al tiempo t y B_1 y B_2 la hormona unida a cada componente, a $t = 0$. De aquí se obtienen los siguientes valores: $B_1 = 15,87$ pM; $k_2 = 0,12$ min⁻¹; $B_2 = 31,43$ pM y $k'_2 = 5,3 \times 10^{-4}$ min⁻¹.

La presencia de esta segunda componente podría representar un segundo sitio de unión (nunca descrito hasta ahora para LH), o bien microagregaciones en la membrana con vesiculización local que impediría la disociación de la hormona involucrada en este proceso. Es de notar que este proceso de microagregación es una de las etapas del fenómeno de internalización del complejo hormona receptor.

Los datos referentes a la asociación y a la disociación hasta aquí descritos sugieren desviaciones de la linealidad en un gráfico de Scatchard realizado en condiciones de equilibrio y utilizando una hormona marcada con baja actividad específica. La figura 11 nos muestra el gráfico correspondiente que, realizado en células enteras, a 34°C y con una ¹²⁵I-hLH de 2,8 uCi/ug. representa un estudio en estado estacionario más que un análisis

de equilibrio. De todas formas, con los debidos recaudos, sirve para comparar este resultado con los ya presentados, también realizados sobre células enteras y a temperatura fisiológica. La curvatura del gráfico de Scatchard, podría deberse a la presencia de dos sitios de unión para LH, descartada la opción de un fenómeno de cooperatividad negativa (figura 10). El análisis del gráfico según la técnica de las pendientes límites (212), para dos sitios de unión, dio los siguientes resultados: $K_{a1} = 11,6 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ con $Q1 = 0,015 \text{ nM}$ y $K_{a2} = 7,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ con $Q2 = 0,048 \text{ nM}$. Este resultado fue observado en cuatro experimentos diferentes, incluyendo dos realizados en membranas testiculares. No se puede aún inferir si este segundo sitio corresponde en realidad a un sitio "receptor" o a un estado especial de la membrana en proceso de microagregación, previo a la internalización de los receptores.

III-Resensibilización testicular

Estudio sobre los efectos de una y dos inyecciones de hCG

Como primer enfoque en el estudio de la respuesta testicular después de una o dos dosis desensibilizantes de hCG (200 UI) se hicieron ensayos "in vivo". Para ello se inyectaron animales con una dosis de gonadotrofina y se analizó la evolución de los niveles de testosterona sérica durante los días subsiguientes. En la figura 12, panel de la izquierda, se ve que luego de una brusca subida durante las primeras 24 horas, la concentración de testosterona comenzó a descender, pese a que los niveles de hCG plasmática permanecieron altos hasta las 48 horas, pero presentó un nuevo pico a las 72 horas. Ya al día 4 los valores volvieron a bajar a los niveles fisiológicos. La administración de una segunda dosis de hCG, 48 horas después de la primera, impidió el descenso en los valores de testosterona a los días 4 y 5 después de la primera inyección.

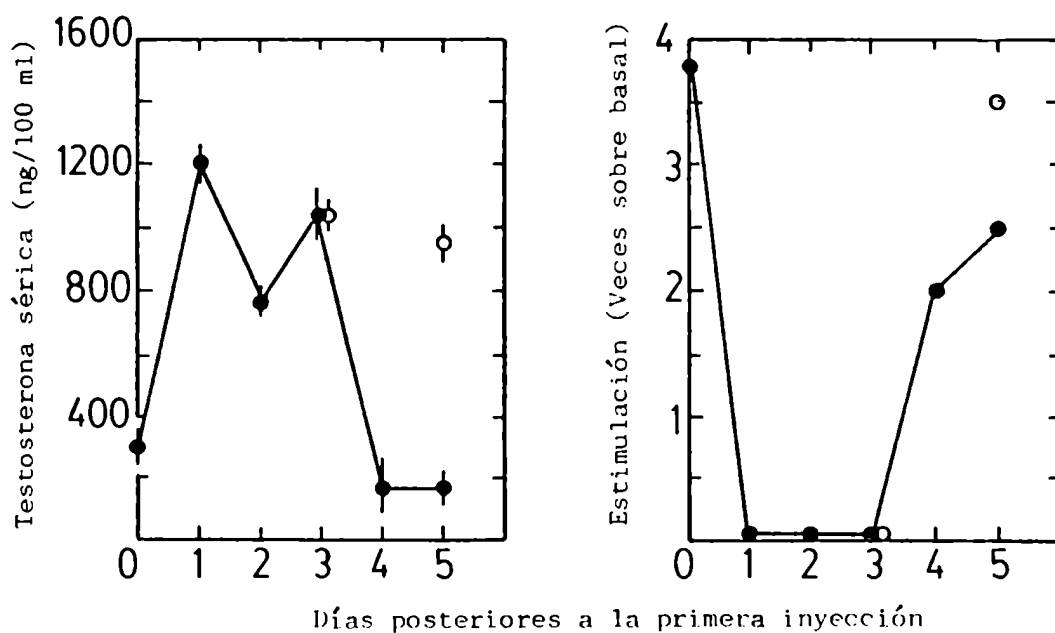


Figura 12: Demostración "in vivo" de la pérdida de respuesta de las células de Leydig, después de una inyección de hCG (●) y efecto de una segunda dosis de gonadotropina (○).

La pérdida de la respuesta "in vivo" de las células de Leydig entre las 24 y las 72 horas posteriores a la inyección de 200 UI de hCG, se demostró porque la administración de una segunda dosis, 2 horas antes de sacrificar los animales, no indujo ningún incremento significativo en la testosterona plasmática (figura 12, panel de la derecha). La respuesta esteroideogénica de las células de Leydig a la estimulación exógena, reapareció recién 96 horas después de la primera inyección.

Una segunda administración de hCG, 48 horas después de la primera inyección, mostró un perfil de estimulación similar (figura 12, panel de la derecha). Aún más, la estimulación al quinto día resultó mayor que la obtenida después de una única dosis de hCG (250% sobre el valor basal para una única inyección versus 350% sobre el nivel basal para la dosis repetida). Este resultado indica que la segunda dosis de hCG, administrada 48 horas después de la primera inyección, no sólo fue incapaz de desensibilizar una vez más la respuesta esteroideogénica, sino que además mostró un aumento en la respuesta a la estimulación exógena con gonadotrofina. Esto llevó a investigar el efecto de este tipo de tratamiento sobre la respuesta de las células

de Levdió "in vitro".

Con el objeto de observar la adaptación del órgano entero a las nuevas condiciones creadas por el tratamiento con gonadotrofina, se decidió (en esta primera parte de la investigación) utilizar testículos intactos en lugar de la fracción intersticial aislada. Esto reflejaría las variaciones que ocurrieran en todos los tipos celulares y que pudieran contribuir al proceso de desensibilización.

Receptores para hCG y respuesta "in vitro" de los testículos de ratas tratadas

Para estos estudios se trabajó en el tercero y quinto día después de la primera administración de hCG, cuando el tejido testicular muestra un estado de desensibilización estable y en el tercer día posterior a la segunda inyección, cuando la respuesta "in vivo" se encuentra aumentada (figura 12, panel de la derecha). De aquí en más, siempre que se mencione el estado resensibilizado se hará referencia a este último tratamiento descripto, salvo que se indique lo contrario.

El número total de sitios receptores se encontró significativamente reducido tres días después de la primera administración de hCG (figura 13) y ligeramente recuperado al quinto día. La inyección de una segunda dosis mantuvo la capacidad de unión al nivel mínimo, cinco días después de la primera dosis.

La respuesta esteroidogénica de testículos de ratas tratadas con 200 UI de hCG se muestra en la figura 14. A las 72 horas, la testosterona basal era mayor respecto de los controles y los testículos no respondieron al estímulo con hCG o db-AMFc. A las 120 horas, se recuperó por completo la respuesta a la gonadotropina y al nucleótido. Cuando se administró una segunda inyección de hCG a los animales, 48 horas después de la primera administración, al estimular los testículos con hCG o db-AMFc, se observó una respuesta superior a la normal cinco días después de la primera inyección (figura 14, panel superior).

Con el fin de ubicar el punto de la "lesión" en el mecanismo de respuesta a la gonadotropina durante la desensibilización y, a la vez, analizar el papel de esa lesión durante el proceso de resensibilización, se midió,

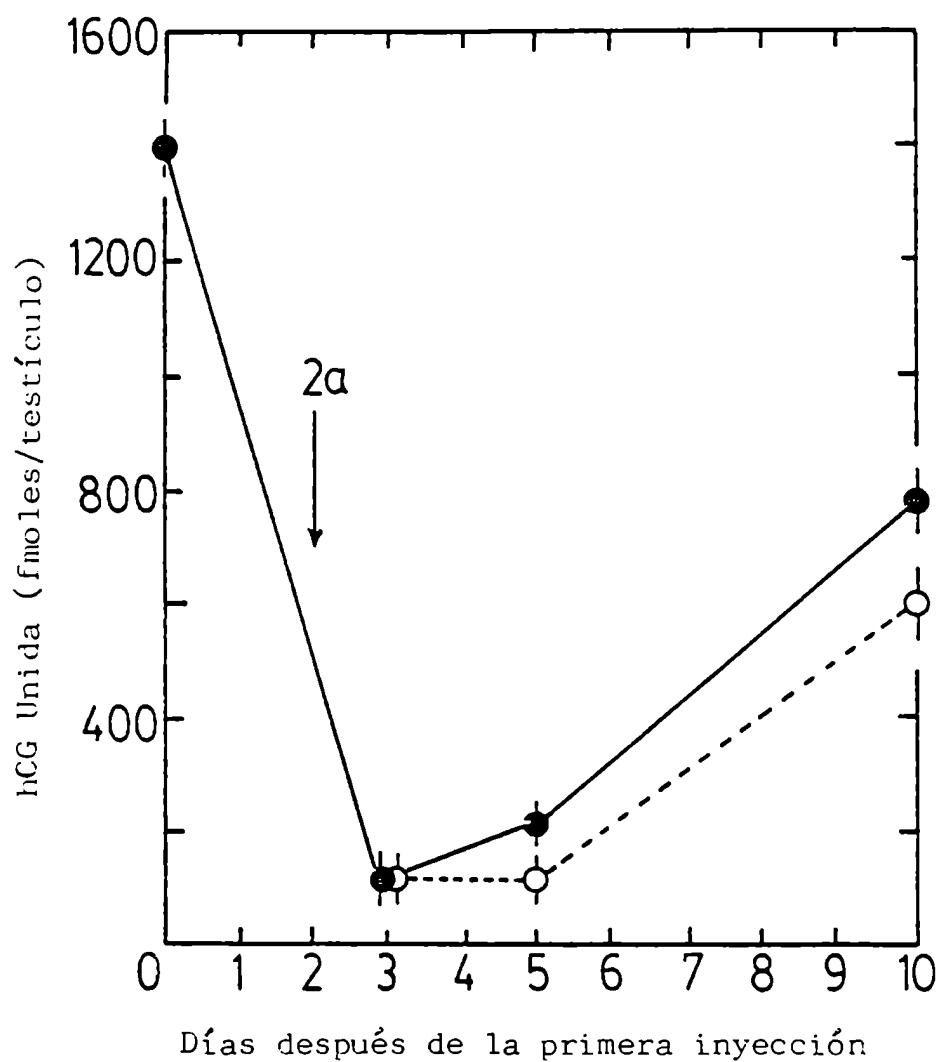


Figura 13: Capacidad de unión de gonadotrofina, después de la administración de una (●) o dos dosis (○) de hCG.

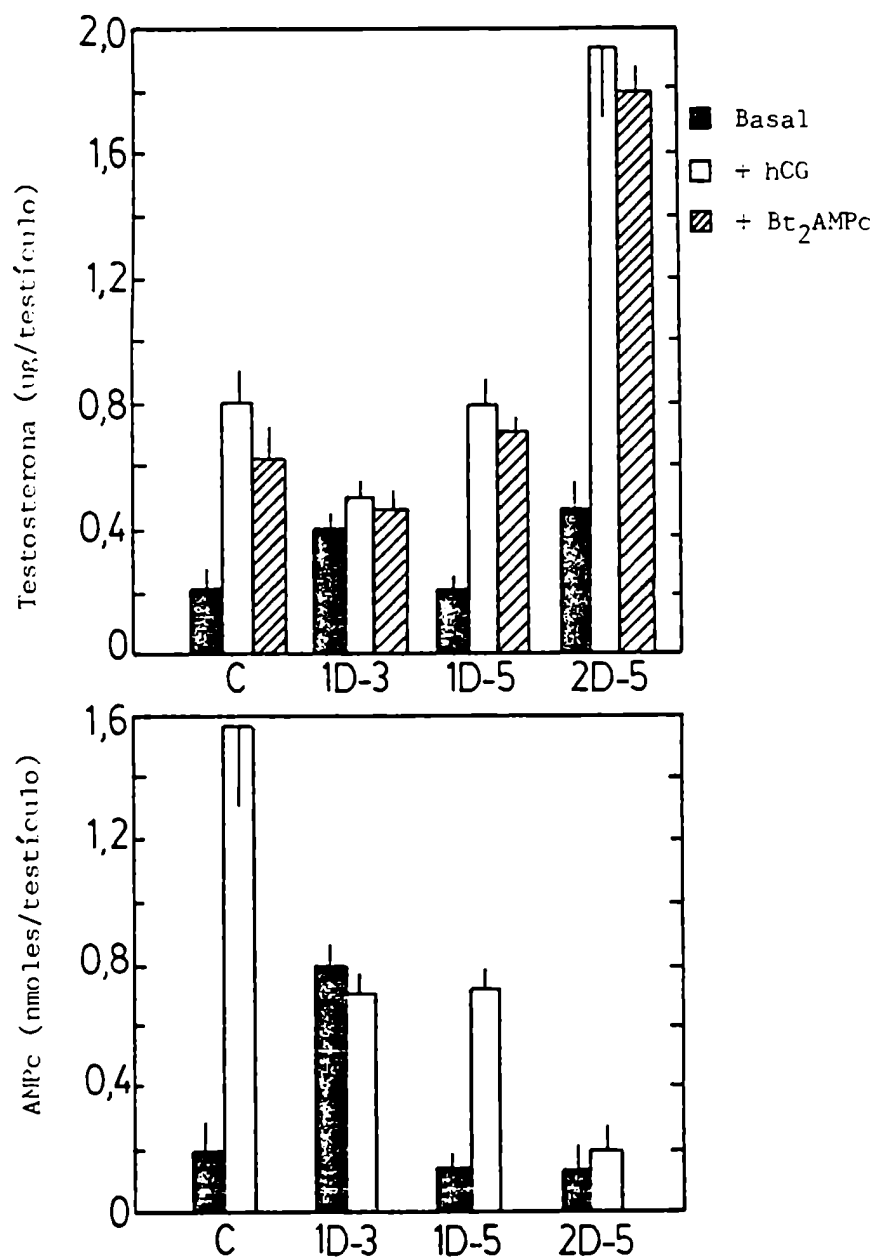


Figura 14: Respuesta "in vitro" de los testículos de ratas tratadas con una o dos dosis de hCG y sacrificadas 3 ó 5 días después de la primera inyección.

en las mismas incubaciones, la producción de AMPc inducida por la hormona. La figura 14 muestra los resultados. Tres días después de la primera inyección, no se observó respuesta mientras que los niveles basales eran elevados, comparados con los controles. Cinco días después de la primera dosis, los niveles de AMPc estaban aumentados, aunque menores que los normales, a pesar de haberse recuperado la producción de testosterona. Por el contrario, la estimulación observada en la biosíntesis de esteroides por los testículos de ratas tratadas con dos dosis de hCG no estuvo acompañada por un aumento significativo en la liberación de AMPc al medio de incubación. Este hecho podría sugerir la presencia de una vía alternativa independiente de AMPc como segundo mensajero o, lo que parece más plausible, que la producción de AMPc en el último caso fuese no detectable por nuestras técnicas y que el sistema fuera sensible a pequeñas variaciones en el contenido o la distribución de AMPc. Esta última posibilidad se encuentra apoyada, al menos en parte, por el hecho de que los testículos obtenidos de ratas tratadas con dos dosis de hCG, respondieron mejor a la estimulación con db-AMPc, indicando que el sistema no

prescinde totalmente del nucleótido. Por otra parte, la estimulación disminuida de la producción de AMPc después de dos dosis de gonadotrofina, comparada con la respuesta obtenida usando testículos cinco días después de una única inyección de hCG, reveló una nueva desensibilización de la adenilato ciclase que no fue correspondida por un nuevo bloqueo en la biosíntesis de testosterona.

Con el objeto de observar los bloqueos enzimáticos más allá del receptor y la adenilato ciclase y dentro del camino esteroidogénico, se determinó la concentración de dos intermediarios: proqesterona y 17 α hidroxiproqesterona. Para este propósito, un grupo de animales (3 ratas) recibió 200 UI de hCG y fue sacrificado tres días más tarde. Otro grupo recibió una segunda dosis, 48 horas después de la primera y fueron sacrificados tres días después (cinco desde la primera dosis). Un tercer grupo recibió solamente vehículo. De cada rata, un testículo fue incubado como se describiera en materiales y métodos, en presencia de hCG (500 ng), y el otro se incubó en las mismas condiciones sin la hormona. En los medios de incubación se determinaron las concentraciones de testosterona, proqesterona y 17 hidroxiproqesterona.

La relaciones proqesterona / testosterona y 17 hidroxiproqesterona / testosterona aumentaron de 0.025 (0.02 - 0.03) para los testículos de los animales controles (en condiciones basales o estimulados con hCG) a 0.14 (0.12 - 0.16) en el caso de los testículos de los animales tratados con una dosis de gonadotrofina. Cuando los animales recibieron una segunda dosis estas relaciones volvieron a los valores controles (0.04; 0.02 - 0.06). Sin embargo, aún en los testículos de las ratas inyectadas con dos dosis de hCG existía una acumulación significativa de los intermediarios dosados, indicando una reversión parcial del bloqueo enzimático.

Estos resultados, tomados en conjunto, presentan un modelo en que los receptores de membrana se encuentran disminuidos, la respuesta en la producción de AMPc "in vitro" a la estimulación con gonadotrofina es, prácticamente, no detectable pero que refleja una reversión parcial de los bloqueos enzimáticos presentes en el estado de desensibilización, con una estimulación máxima, o inclusive supramáxima, de la producción de testosterona.

Con el objeto de evaluar la respuesta de los testículos cuando la segunda administración de hCG se realizaba en la etapa de recuperación después del estado desensibilizado, los animales fueron inyectados siete días después de la primera inyección y sacrificados 72 horas más tarde. La figura 15 muestra que la capacidad de los testículos para unir la gonadotrofina se encuentra significativamente disminuida tres días después de la primera dosis de hCG y parcialmente recuperada siete días más tarde. Cuando se administró por segunda vez hCG, siete días después de la primera inyección, la capacidad de unión, medida tres días más tarde (10 después de la primera dosis) fue significativamente reducida, indicando una nueva etapa de regulación negativa de los sitios de unión para hCG.

Sin embargo esta regulación negativa no estaba acompañada por una disminución concomitante en la producción de testosterona, como se muestra en la figura 16 (panel superior). Por otra parte, la producción de AMPc fue abolida (determinada según la técnica descrita) confirmando la desensibilización de la adenilato ciclase (figura 16, panel inferior). Una vez más, puede observarse

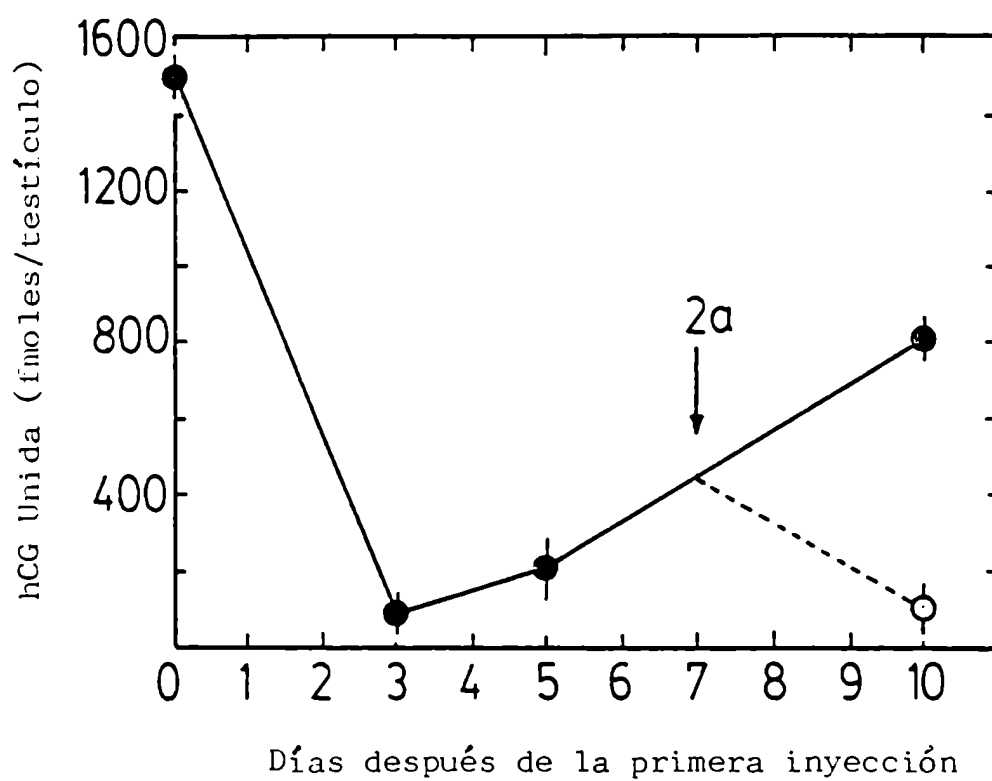


Figura 15: Capacidad de unión de gonadotropina, después de una (●) o dos (○) dosis de hCG.

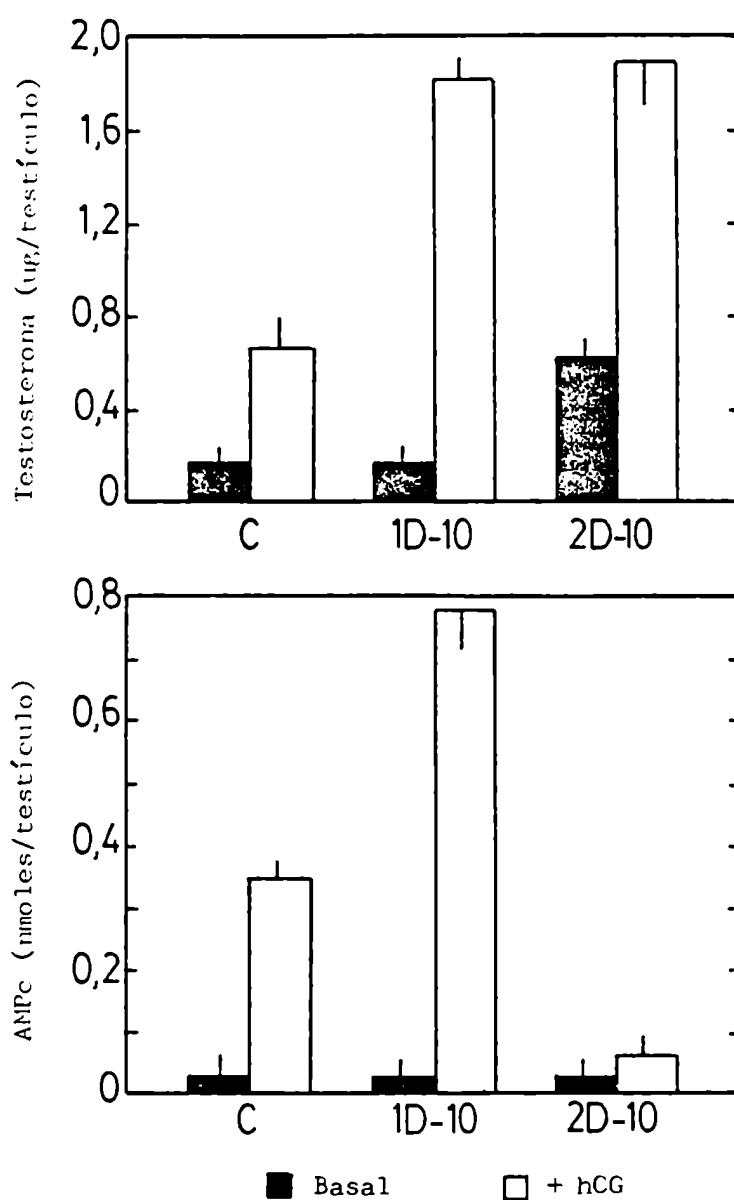


Figura 16: Respuesta "in vitro" de testículos de ratas tratadas con una o dos dosis de hCG, sacrificadas 10 días después de la primera inyección.

que, luego de una segunda administración de hCG, el sistema comienza a responder a la estimulación exógena por gonadotrofina con un número reducido de sitios de unión para hCG, producción de AMPc no detectable en el medio de incubación y una síntesis de testosterona normal o incrementada, como si no pudiese ser desensibilizado otra vez, luego de la primera dosis de hCG.

Para ahondar en el mecanismo de este fenómeno de resensibilización, se debió tener en cuenta la existencia de varios tipos celulares, normalmente considerados como de células de Leydig. La resensibilización podría ser reflejo de cambios selectivos en tales poblaciones, como ser un número aumentado de células maduras, o la evolución de algún tipo celular minoritario hacia una esteroidogénesis refractaria a la desensibilización.

Estudio de la resensibilización en las distintas poblaciones de células de Leydig

Antes de abordar el efecto de los diversos tratamientos con gonadotrofina sobre las distintas poblaciones de células de Leydig, fue necesario poner a punto el método de separación de los diferentes tipos celulares, caracterizarlos en cuanto a la unión de LH y su respuesta esteroidogénica. Para esto, después de obtener la fracción de células intersticiales totales y de haber eliminado los glóbulos rojos, se las incubó con ^{125}I -hLH durante una hora a 34°C y se lavó la hormona libre. La suspensión celular fue luego sometida a centrifugación en un gradiente discontinuo de Metrizamida (ver materiales y métodos). La figura 17 muestra el perfil de radiactividad que presentó el gradiente obtenido a partir de células de ratas controles. Se ve la aparición de cuatro bandas capaces de unir LH. Utilizando la nomenclatura sugerida por el grupo de Payne (147) se denominaron, desde arriba hacia el fondo del gradiente, O; IA; IB y II.

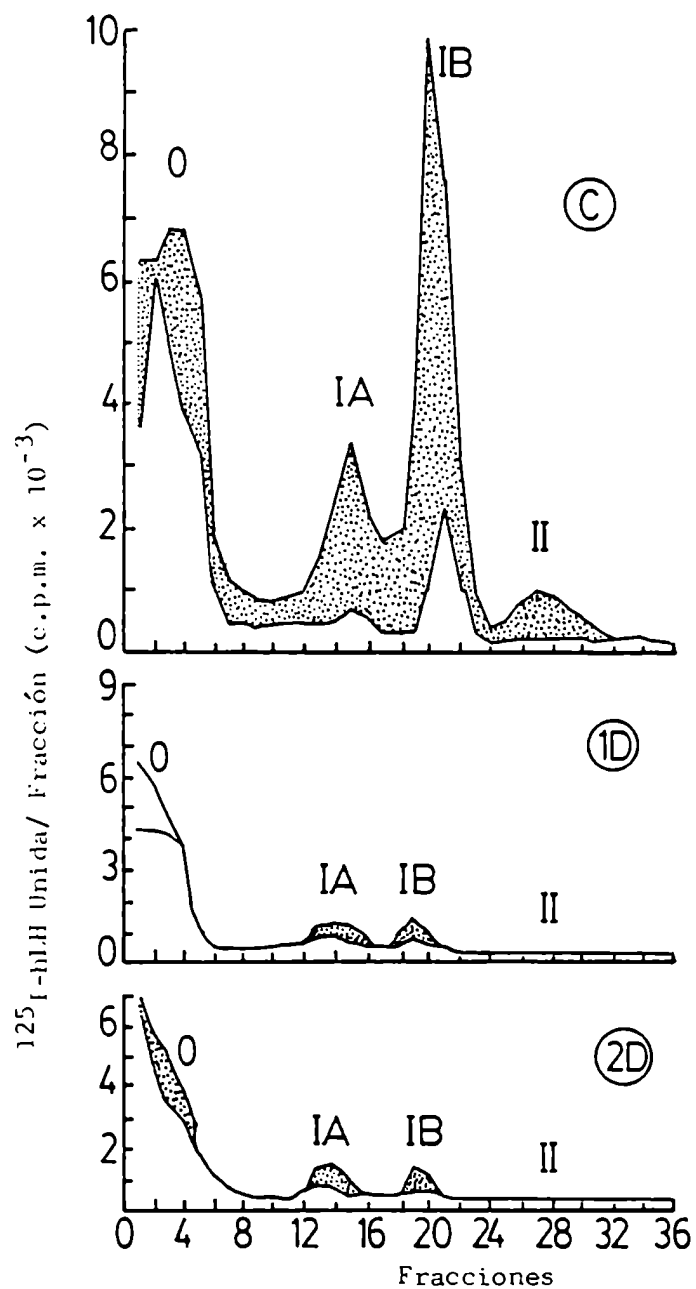


Figura 17: Perfil de unión de hLH a subpoblaciones de células de Leydig, de ratas controles y tratadas con una o dos dosis de hCG, separadas por gradiente de Metrizamida.

En otro experimento, las células de Leydig provenientes de ratas controles se separaron en las cuatro subpoblaciones. Cada banda se sometió a un estudio de receptores según el método de Scatchard. Todas las bandas presentaron igual constante de afinidad ($K_a = 2 - 4 \times 10^{10} M^{-1}$), con un número similar de sitios de unión por célula. Cuando las distintas poblaciones se estimularon con cantidades crecientes de LH "in vitro" se construyeron las curvas dosis respuesta para la producción de testosterona. La banda 0 no fue capaz de producir testosterona en respuesta al estímulo hormonal. Las curvas correspondientes a las demás poblaciones se muestran en la figura 18 A. A partir de estas curvas dosis respuesta se calculó la sensibilidad de cada una de las poblaciones. Para ello se utilizó como parámetro el ED50, o sea la concentración de LH necesaria para obtener el 50% de la respuesta máxima. A menor valor del ED50, más sensible es el sistema. Los valores de los ED50 fueron entonces: para la banda IA, 0,04 ng hLH/ml; para la IB 0,04 ng hLH/ml y para la II 0,05 ng hLH/ml. Se puede apreciar que no existen diferencias significativas entre las diferentes poblaciones de células de Leydig de animales controles, por

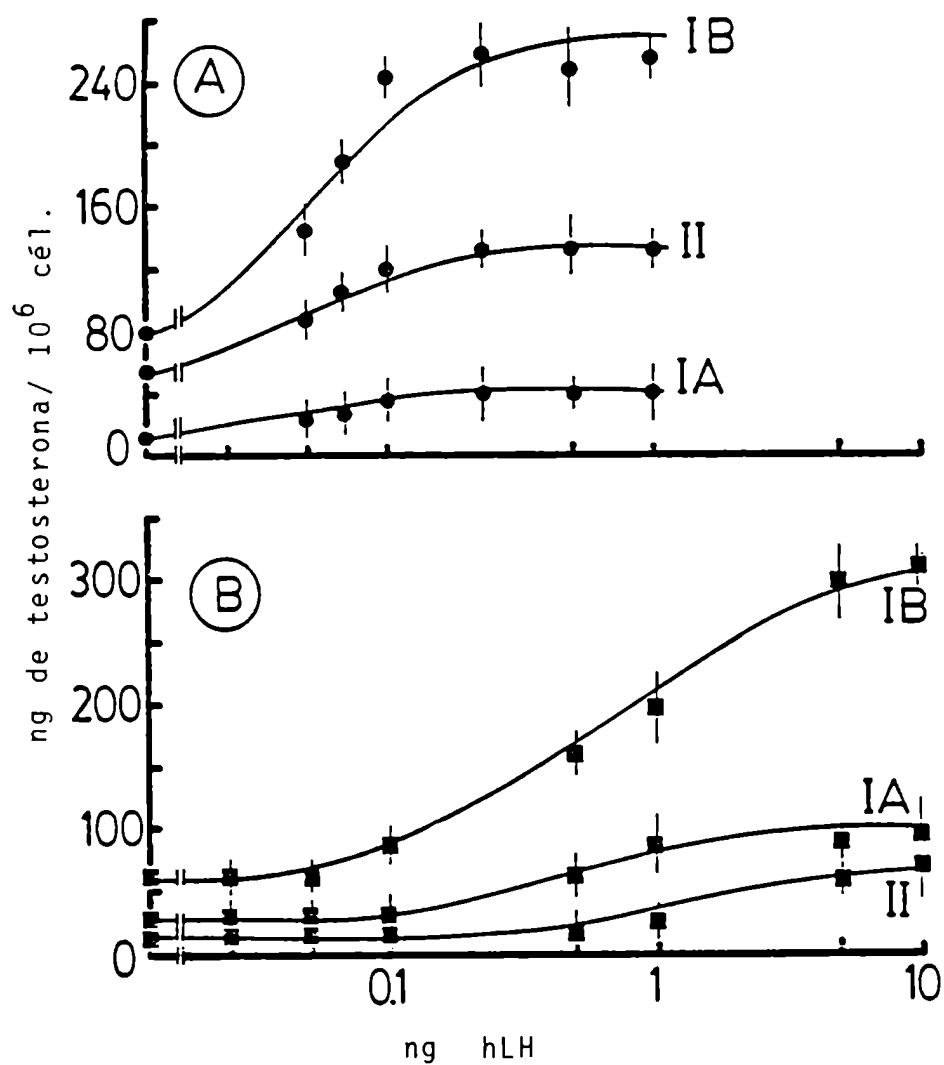


Figura 18: Curvas dosis - respuesta para la producción de testosterona en las distintas poblaciones celulares de animales controles (A) y resensibilizados (B).

lo menos en lo que concierne a la unión de la LH y la estimulación de la esteroidogénesis por la gonadotrofina.

Como se mencionara anteriormente, la separación de células de Levdiq de animales controles, previamente marcadas con ^{125}I -LH, en un gradiente discontinuo de Metrizamida permitió distinguir cuatro picos radiactivos (figura 17, panel superior). El efecto de los distintos tratamientos con hCG, una única dosis y dos dosis con 48 horas de intervalo, sobre la capacidad de unión de estas bandas se observa en la figura 17, paneles medio e inferior respectivamente. Dado que igual cantidad de células se sembraron en cada gradiente, la disminución de los sitios de unión específicos refleja el fenómeno de regulación negativa para los receptores de LH. Ambos tratamientos produjeron una disminución de los receptores disponibles que va del 90 al 100% en todas las poblaciones. Esta disminución en el número de sitios de unión para LH fue corroborada con estudios de unión de ^{125}I -LH a células obtenidas por fraccionamiento a través de gradientes de Metrizamida, realizando las incubaciones luego de desarmar los gradientes y analizando los resultados según el método de Scatchard.

Como paso siguiente se estudió la respuesta a la estimulación "in vitro" con cantidades saturantes de gonadotrofina en las distintas poblaciones. En la figura 19 se muestran los niveles de producción de testosterona y AMPc luego de la incubación de las células provenientes de las distintas poblaciones con 10 ng de hLH. En el panel C se graficaron las respuestas correspondientes a las células extraídas de animales controles. En lo que se refiere a la producción de testosterona, se confirmó lo demostrado en la figura 18 A: la banda IB es la que tiene una mayor respuesta máxima, seguida en orden decreciente por la II y la IA. La banda O prácticamente no produce testosterona ante el estímulo hormonal. Por otro lado, la producción de AMPc sigue un perfil similar a la del esteroide. La administración de una dosis de hCG tres días antes del sacrificio de los animales y de la determinación de las respuestas "in vitro" (figura 19, panel 1D) resulta en un estado de desensibilización, caracterizado por una falta de respuesta a la gonadotrofina en la biosíntesis de testosterona así como de AMPc, pese a que las concentraciones basales de esos dos compuestos secretados al medio de incubación son mayores que las correspondientes

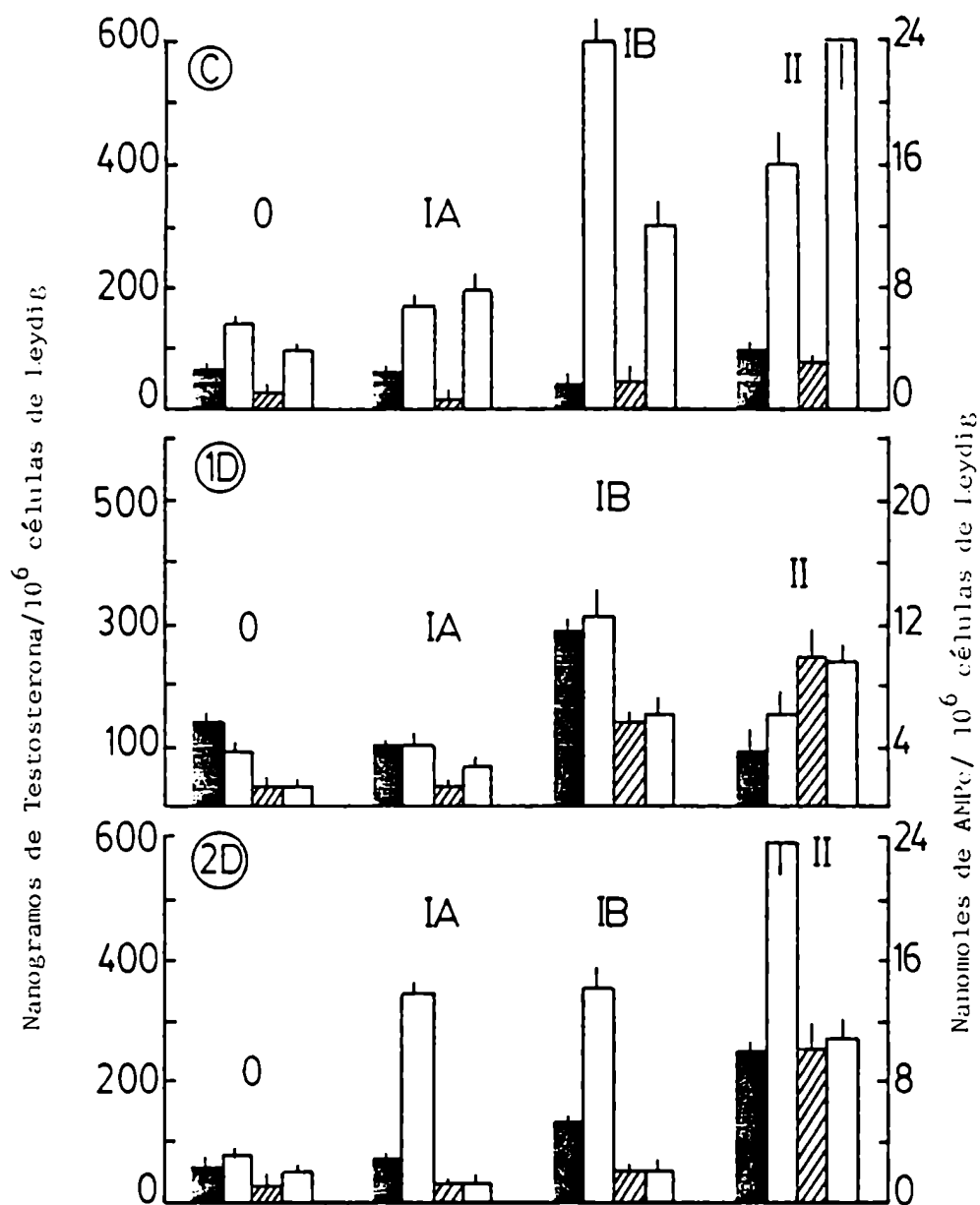


Figura 19: Estimulación de la producción de testosterona y AMPc en las poblaciones de células obtenidas de ratas tratadas y controles. Basal testosterona (■); basal AMPc (□); estimulación con gonadotropina (▨).

a los animales controles. Cuando se administró una segunda inyección de hCG, 48 horas después de la primera, tres días más tarde se alcanza el estado de resensibilización. En el panel 2D de la figura 19, se ilustra este hecho: todas las poblaciones (exceptuando la 0) responden a la estimulación "in vitro" con 5 ng de hLH produciendo testosterona en cantidades similares o superiores a las células controles. En cambio no hay incremento en la secreción de AMPc inducido por la hormona.

Para estudiar la sensibilidad de la respuesta esteroideogénica a la LH, se incubaron las células de Leydig de las distintas poblaciones, provenientes de animales resensibilizados, con cantidades variables de hLH (0,001 - 10 ng). Se construyeron así gráficos de producción de testosterona en función de la hLH agregada (figura 18 B). Es interesante observar el corrimiento de estas curvas dosis - respuesta hacia la derecha (menor sensibilidad) respecto de las curvas correspondientes a los animales controles (panel A). Este desplazamiento es equivalente en las tres poblaciones estudiadas y se traduce en los ED50 que van de $0,043 \pm 0,006$ ng hLH/ml para el promedio de las

tres bandas controles a $0,69 \pm 0,2$ para las bandas de los animales tratados. Este cambio de la sensibilidad se reflejó también en las concentraciones necesarias para obtener una respuesta máxima que se alcanzó con $0,5 \text{ ng}$ de LH en los controles y requirió entre $5 \text{ y } 10 \text{ ng}$ de LH en los tratados.

En la tabla 1 se muestra el aumento en las relaciones progesterona / testosterona en los medios de incubación de las tres poblaciones de células de Leydig correspondientes a ratas desensibilizadas, en condiciones basales o de estimulación máxima (10 ng de hLH). El promedio de estas relaciones aumentó de $0,044 \pm 0,012$ para los controles a $0,229 \pm 0,073$ para los tratados con una única dosis de hCG. La segunda dosis de hCG vuelve a bajar estos valores llevándolos a un promedio de $0,10 \pm 0,036$, siendo por lo tanto el comportamiento de las tres poblaciones muy similar en cuanto a la reversión del bloqueo esteroideogénico.

Todos los resultados mostrados en esta sección parecen coincidir en el hecho que las tres poblaciones de células de Leydig con capacidad esteroideogénica se comportan de un modo homogéneo ante los procesos de desensibilización y resensibilización. Por este motivo,

Tabla 1.- Relaciones progesterona/testosterona en las diferentes poblaciones de células de Leydig.

GRUPOS	Banda IA		Banda IB		Banda II	
	Basal	+hCG	Basal	+hCG	Basal	+hCG
CONTROL	0.0039	0.0050	0.0039	0.0046	0.0025	0.0036
1 Dosis hCG	0.0226	0.0230	0.0177	0.0192	0.0369	0.0290
2 Dosis hCG	0.0088	0.0125	0.0067	0.0072	0.0105	0.0116

Los datos representan las relaciones progesterona/testosterona, obtenidas como promedio de tres incubaciones independientes.

los estudios siguientes sobre los mecanismos de la resensibilización se realizaron sobre células de Leydig totales. Con ese fin las células intersticiales se purificaron a través de un colchón de Metrizamida al 11%, obteniéndose entonces la sumatoria de las bandas IA, IB y II.

Papel del AMPc en el estado resensibilizado

Como primera etapa del estudio sobre células totales se analizó la sensibilidad de la respuesta esteroidogénica en las células resensibilizadas y en las controles. En la figura 20 se muestran las curvas dosis respuesta (producción de testosterona versus concentración de LH) correspondientes a células controles, desensibilizadas y resensibilizadas, en un experimento tipo. La respuesta de las células controles prácticamente no presenta umbral y llega a su máximo con una concentración de hLH de 1 nq/ml. El ED50 calculado como promedio de 8 experimentos fue de 0.047 ± 0.02 nq hLH/ml. Las células provenientes de animales tratados con una única dosis de hCG, tres días antes de ser sacrificados, no respondieron en todo el rango de concentraciones de hLH usado, confirmando así la

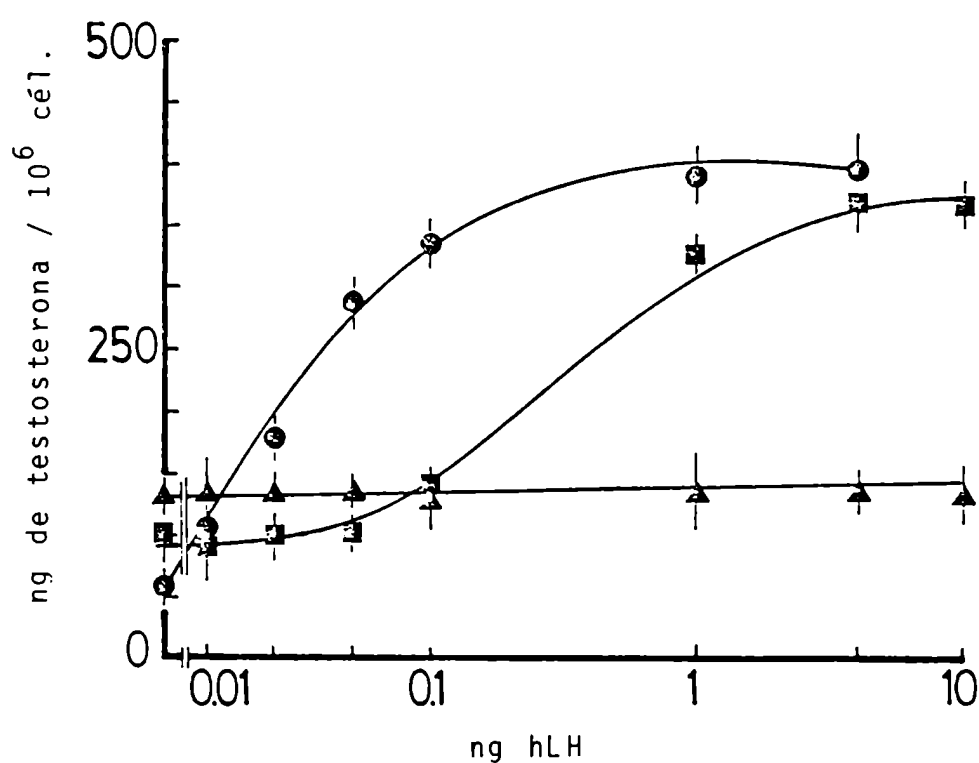


Figura 20: Curvas dosis - respuesta para la producción de testosterona de células de Leydig aisladas de ratas controles (●) y tratadas con una (▲) o dos (■) inyecciones de hCG.

desensibilización testicular. En cambio, cuando los animales fueron tratados con una segunda dosis de gonadotrofina, 48 horas después de la primera y tres días antes de ser sacrificados, las células presentaron una buena respuesta en la producción de testosterona. Esta respuesta, sin embargo, requirió una concentración de por lo menos 0,1 ng/ml de hLH para manifestarse, concentración con la cual las células controles alcanzaban el 80% de su respuesta máxima. La máxima producción de testosterona se obtiene en las células resensibilizadas recién con 5 ng de la LH utilizada, contra 0,5 ng en el caso de las controles. Todo este corrimiento hacia la derecha de la curva dosis respuesta se tradujo en un ED50, promedio de 6 experimentos independientes, de 0.45 ± 0.10 ng hLH/ml, o sea un orden mayor que el valor obtenido de las curvas correspondientes a los animales sin tratar.

Para determinar si este corrimiento en la sensibilidad de la maquinaria esteroideogénica a la estimulación con LH se debía a algún bloqueo posterior a la producción de AMPc, se construyeron curvas de producción de testosterona usando db-AMPc como agente estimulante. En la figura 21 se observan los gráficos correspondientes a las curvas dosis

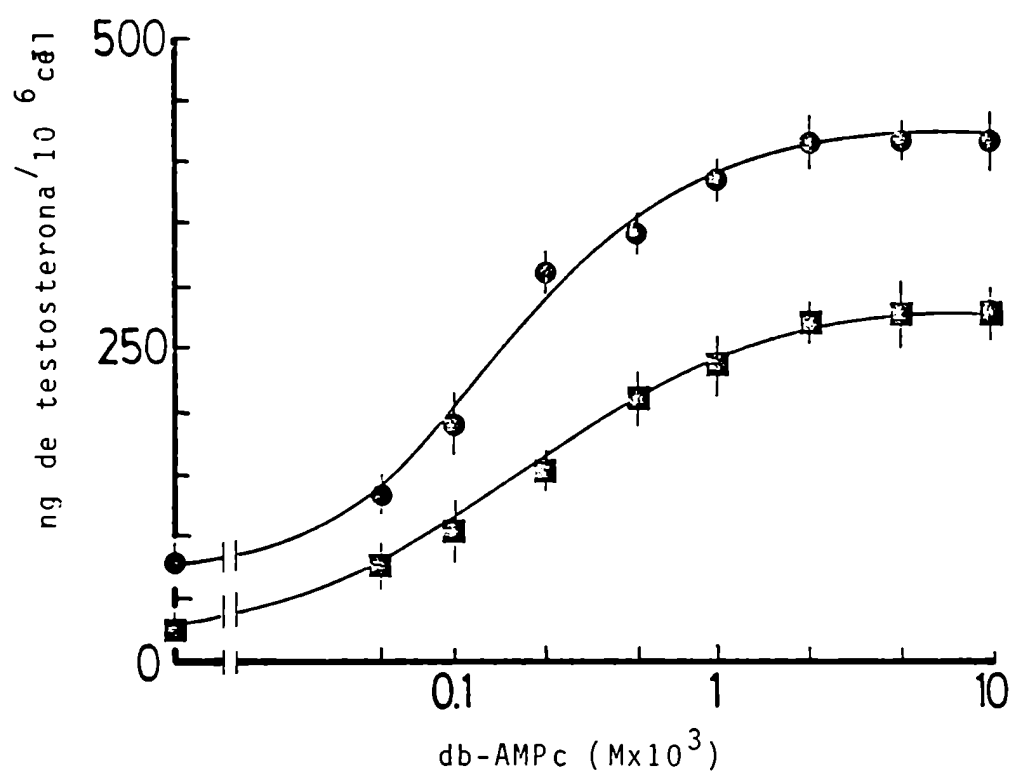


Figura 21: Curvas dosis - respuesta para la producción de testosterona en células controles (■) y resensibilizadas (●).

respuesta de células controles y provenientes de animales tratados con dos dosis de hCG (resensibilizados). De estas dos curvas se infiere que la sensibilidad es la misma para los dos grupos, siendo los ED50 respecto del db-AMFc 0.40 ± 0.23 mM ($n = 3$) para el control y 0.41 ± 0.16 mM para el tratado. Esto demostró que la estimulación con db-AMFc fue capaz de inducir una respuesta esteroidogénica en las células resensibilizadas igual a la de los controles, en cuanto a la magnitud y la sensibilidad. Se confirmó entonces la reversión de los bloqueos enzimáticos producidos por la primera dosis de hCG. Estos resultados sugieren además que el AMFc podría seguir ejerciendo un papel de segundo mensajero en el estado resensibilizado.

La confirmación de esta hipótesis se obtuvo mediante el estudio de la ocupación de los sitios de unión intracelulares para AMFc durante la estimulación con LH "in vitro". Para ello, las células de Leydig provenientes de animales controles o resensibilizados se incubaron con diversas cantidades de hLH durante una hora. Después de la incubación se determinaron los sitios de unión intracelulares libres para AMFc. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 22. Tanto en las

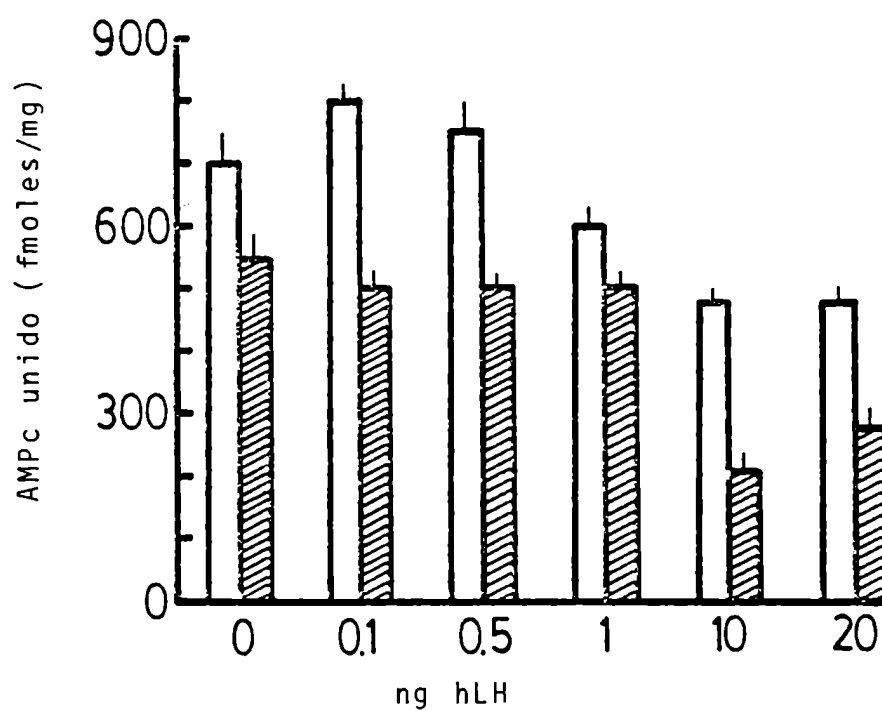


Figura 22: Determinación de los sitios intracelulares para AMPC disponibles después de la estimulación "in vitro" de las células controles (□) y resensibilizadas (▨) con distintas cantidades de LH.

células controles como en las resensibilizadas hubo una ocupación de los sitios de unión para AMFc que se correlacionó con la concentración de LH utilizada para la estimulación. Sin embargo aquí también se pudo observar que en las células resensibilizadas se requiere una mayor concentración de gonadotrofina, en este caso para alcanzar los mismos niveles de ocupación que en las células controles. Se necesitó más de 1 nq de hLH (10 nq en las condiciones experimentales utilizadas) para obtener una ocupación significativa, mientras que en las controles la disminución de los sitios disponibles para AMFc se detectó con una concentración de LH de 1 nq. Este resultado reforzó la hipótesis de un papel intermediario del nucleótido en la respuesta esteroidogénica de las células resensibilizadas.

La disminución de la sensibilidad a la gonadotrofina en las células resensibilizadas podría tener origen entonces en el bajo número de receptores, lo que produciría cantidades muy pequeñas de AMFc, no detectables por la técnica aquí utilizada. Un estado intermedio entre el control y el resensibilizado se puede obtener en las células de Leydig extraídas de testículos de ratas

infectadas con una sola dosis de hCG y sacrificadas cinco días después. En este momento las células han recuperado parcialmente sus receptores y la respuesta esteroidogénica es normal. Las curvas dosis - respuesta de la figura 23 muestran que a ese número intermedio de receptores le correspondió una sensibilidad también intermedia en la producción de testosterona frente a la estimulación con LH. Los ED50 en este experimento fueron 0,02; 0,09 y 0,3 ng hLH/ml para las células provenientes de animales controles, infectados con una dosis de hCG cinco días antes y resensibilizados, respectivamente.

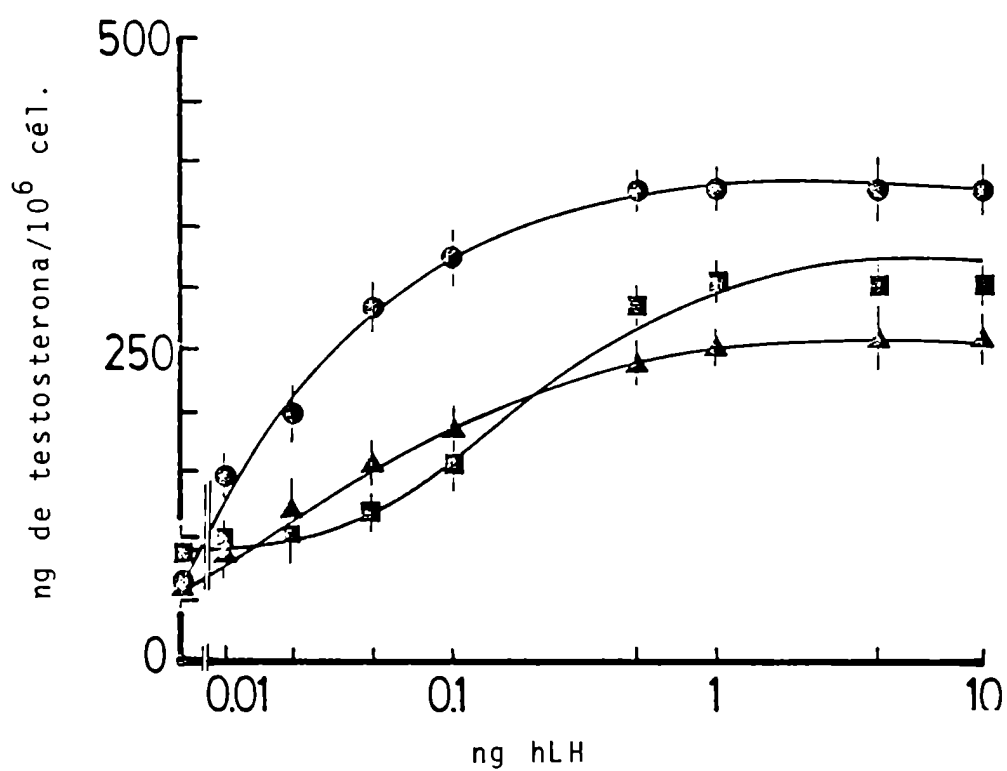


Figura 23: Curvas dosis-respuesta para la producción de testosterona en células de Leydig provenientes de animales controles (●), inyectados 5 días antes (▲) y resensibilizados (■).

IV-Procesamiento de la LH y respuesta celular

Dada la estrecha correlación existente entre el número de receptores disponibles para LH y la sensibilidad de la respuesta desencadenada por la hormona, se estudiaron las causas que determinan la desaparición de los receptores después de un tratamiento agudo con hCG. Para ello las células de Leydig obtenidas de animales de los tres grupos experimentales (controles, desensibilizados y resensibilizados) se sometieron al tratamiento ácido para desprejar la hormona unida a la superficie celular y luego se determinaron los sitios de unión para ^{125}I -hLH. En la figura 24 se observan los datos correspondientes a las uniones específicas cada 10^6 células en los tres grupos, antes y después del tratamiento ácido. Un 35% de los receptores para LH totales fueron recuperables por el tratamiento ácido en las células desensibilizadas, mientras que en las células resensibilizadas la desaparición de los receptores fue prácticamente total. Esto demuestra que una sola dosis de hCG no es suficiente para internalizar todos los sitios de unión, aunque los que quedan en la membrana se hallan ocupados por la gonadotrofina, tres días después

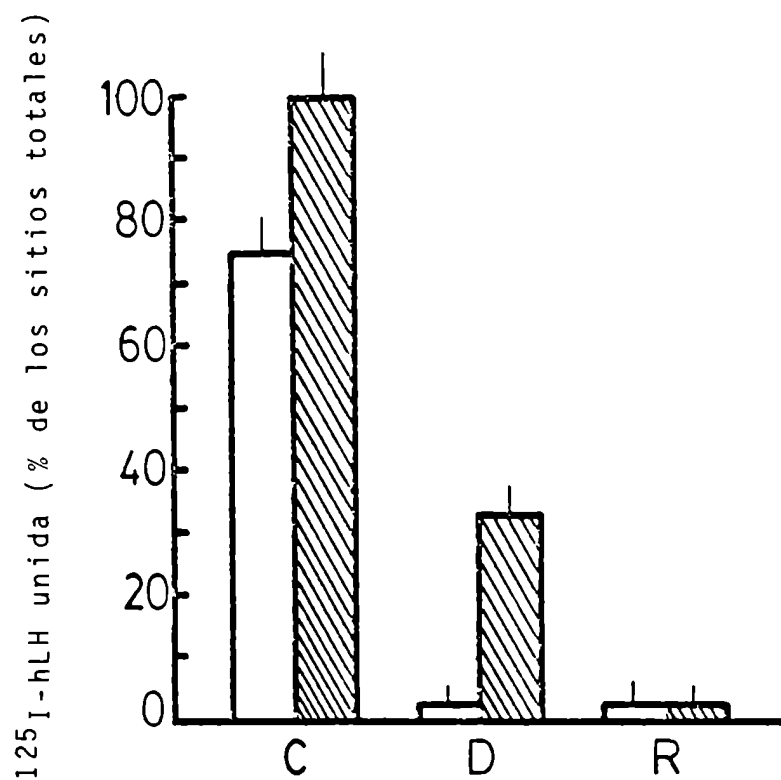


Figura 24: Determinación de los sitios de unión libres (□) y totales (▨) para LH en células controles, desensibilizadas y resensibilizadas.

de la inyección. En cambio, la segunda dosis provoca la desaparición de casi el 100% de los receptores para LH.

Estudios cinéticos de la internalización y la degradación

Para estos estudios se utilizaron dos esquemas experimentales. En el primero de ellos, las células de Leydig purificadas se incubaron en M199 sin o con distintos agregados y en presencia de ^{125}I -hLH (aproximadamente 107 cpm). En todos los casos se trabajó con tubos paralelos que contenían un exceso de hCG (1.000 UI) para el cálculo de las uniones inespecíficas. Las incubaciones se realizaron durante 90 minutos a 4°C para minimizar los efectos de la internalización y la degradación. Después de esta preincubación y con el fin de eliminar la hormona libre, las células se lavaron dos veces en frío y se resuspendieron en M199 con o sin los distintos agregados. Una vez divididas en alícuotas de 1 ml se pasaron a 34°C, temperatura a la que se incubaron durante distintos tiempos. Finalizada la incubación, los tubos se pasaron a 4°C y se centrifugaron. El medio sobrenadante se utilizó para la determinación de los productos de degradación de la hormona marcada por precipitación con TCA. El precipitado

celular se contó en un contador de centelleo sólido y luego se trató con ácido, separándose la hormona unida a la superficie de la internalizada. El nuevo precipitado se contó.

Cada punto de la figura 25 representa el valor de las cuentas específicas obtenidas por duplicado en un experimento tipo. Inicialmente, un 70% de la hormona podía ser liberada con el ácido, pero la cantidad de hormona unida a la superficie disminuyó con el tiempo. La caída de la curva muestra una cinética bifásica con una componente de rápida endocitosis presente durante los diez primeros minutos y una segunda etapa con una internalización mucho más lenta. Paralelamente hubo un aumento en la hormona presente en el interior de las células que alcanzó un máximo entre los 20 y los 40 minutos. Después de este período la radiactividad en el interior comenzó a disminuir, lo que coincidió con la aparición, después de un período de latencia de unos 20 minutos, de productos de la degradación hormonal.

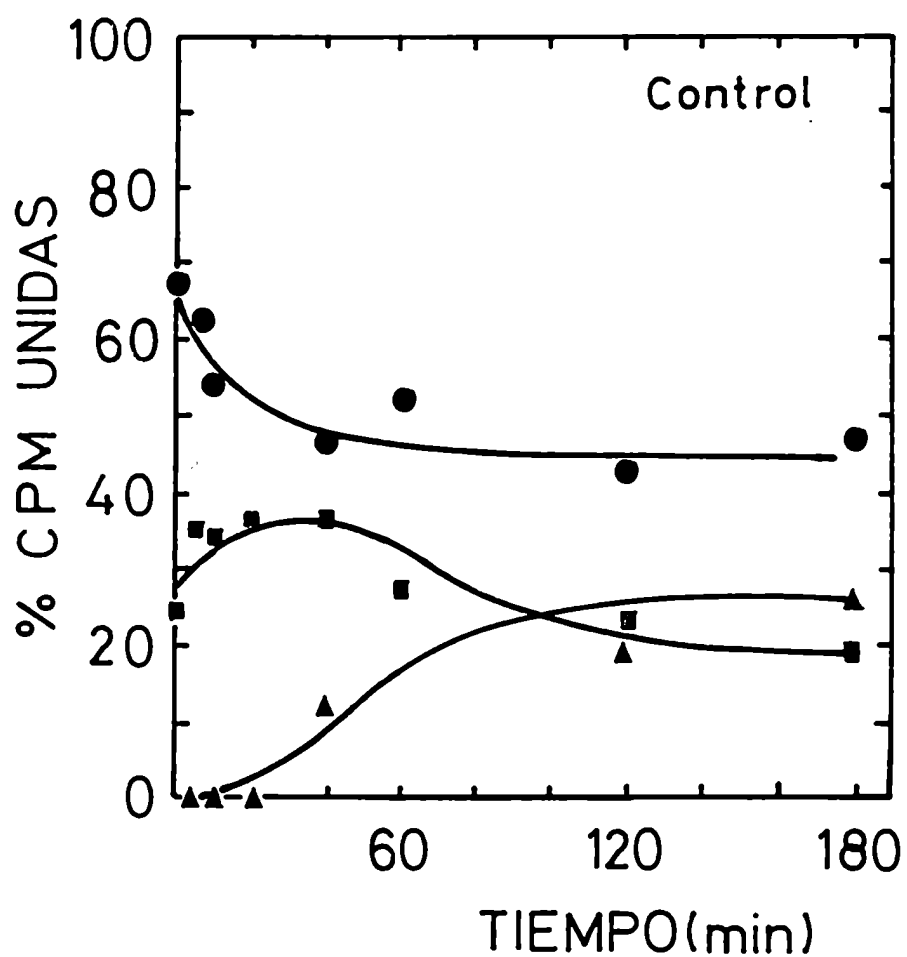
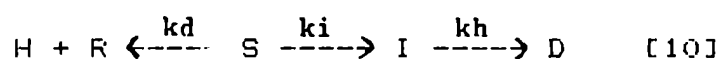


Figura 25: Cinéticas de internalización y degradación de la ^{125}I -hLH en células premarcadas. Radiactividad liberable por tratamiento ácido (●), presente en el interior celular (■) y producto de la degradación hormonal (▲).

A partir de los datos de este tipo de experimentos se pueden calcular algunos parámetros que describen cuantitativamente al sistema y permiten la comparación de distintos tratamientos. Para ello se postula un modelo simplificado que abarca, a grandes rasgos, los procesos a los que es sometida la hormona desde que las células previamente marcadas se colocan a 34°C:



donde H es la hormona libre en el medio de incubación, S la unida a la superficie celular, I la presente en el interior de la célula y D los productos de degradación liberados al medio. Las constantes cinéticas definidas son k_d de disociación, k_i de endocitosis y k_h de hidrólisis o degradación. Obviamente estas constantes representan la suma de numerosos procesos que no fueron analizados individualmente y que engloban fenómenos como la agregación de receptores, el tránsito vesicular del complejo hormona receptor, el procesamiento del ligando, el posible reciclado de las moléculas de membrana, la exocitosis de los productos de degradación, etc.. En esta etapa de la investigación se tomaron en cuenta el pasaje de la hormona

desde la superficie hasta el interior celular y la degradación. La disociación no se consideró ya que en los tiempos y las condiciones utilizadas involucró menos del 4% del total de la hormona unida inicialmente.

A partir de [10] se puede escribir:

$$-\frac{dS}{dt} = (k_e + k_d) S$$

Si, como se mencionó anteriormente, la disociación es despreciable

$$-\frac{dS}{dt} = k_e S \quad [11]$$

Integrando [11] entre $t = 0$ y $t = t$:

$$S_t = S_0 e^{-k_e t} \quad [12]$$

La ecuación [12] corresponde a una función del tipo exponencial. Sin embargo, para obtener una buena correlación entre los datos de la curva de hormona presente en la superficie (figura 25) y una ecuación como la [12] hubo que desdoblar la expresión en dos componentes:

$$S_t = S_{o1} e^{-k_{e1}t} + S_{o2} e^{-k_{e2}t} \quad [14]$$

Mediante el uso de una computadora se ajustaron los datos experimentales a la ecuación [14]. Los valores calculados, resultantes de un promedio de 4 experimentos, figuran en la tabla 2.

Para la k_h se puede considerar:

$$v_h = \frac{dD}{dt} - k_h I \quad [15]$$

En la práctica se ajustó la curva de aparición de productos degradados a una función potencial y se calculó la derivada para cada tiempo (esto equivale a la velocidad de hidrólisis (v_h)). Con estos valores se construyó la recta v_h versus I , cuya pendiente es la constante k_h . El valor obtenido, también promedio de 4 experimentos independientes, fue $2,9 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (tabla 2).

Posteriormente se utilizó este modelo para analizar los efectos de algunas drogas sobre la internalización y la degradación de la LH en células de Leydig. En la figura 26 se observa el efecto que tuvo una preincubación de las células a 34°C en presencia de 50 uM de cloroquina. Esta preincubación se llevó a cabo durante 60 minutos, después

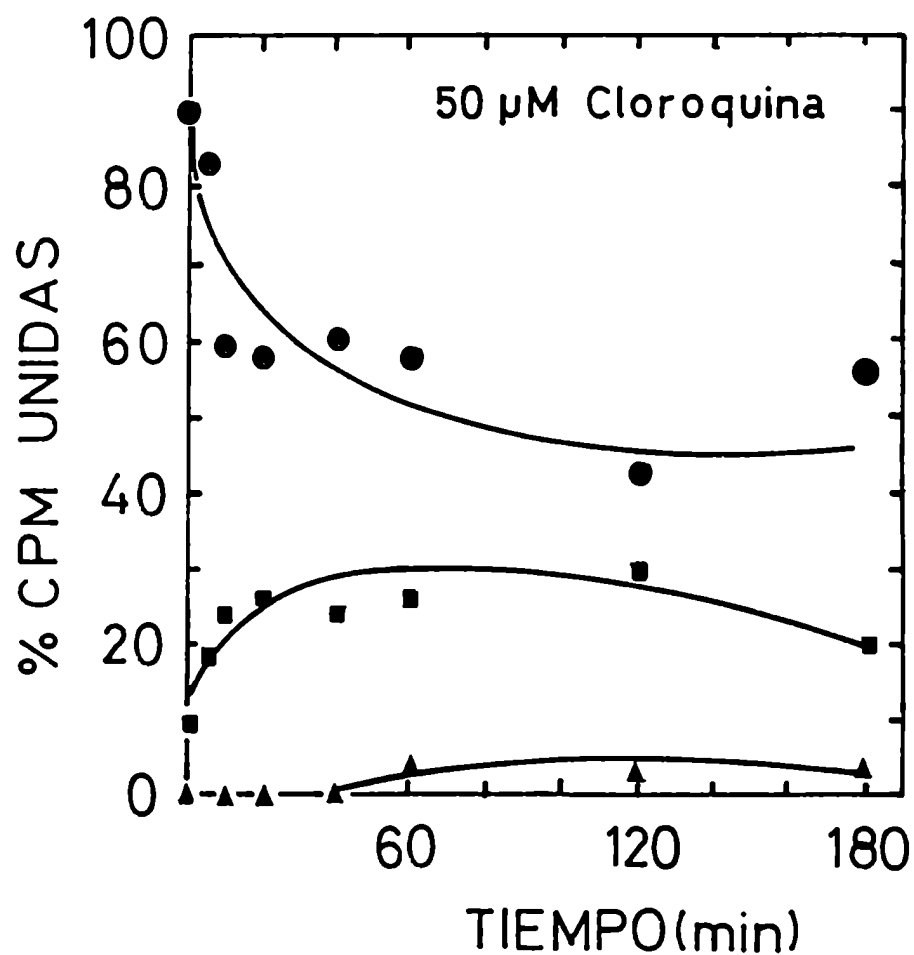


Figura 26: Cinéticas de internalización y degradación de ^{125}I -hLH en células de Leydig premarcadas y tratadas con cloroquina (50 μM). Superficie (●), interior (■) y degradada (▲).

de los cuales se agregó a las células la hormona marcada. Los pasos siguientes son idénticos a los ya descritos, salvo que, después de los lavados, las células fueron resuspendidas en M199 conteniendo 50 μ M de cloroquina. Esta agente lisosomotrópico no afectó a la curva de internalización que resultó igual a la de los controles, lo que se verificó mediante el cálculo de las constantes (tabla 2). En cambio se observó una inhibición prácticamente total de la degradación, con la correspondiente acumulación de radiactividad dentro de la célula. El efecto lisosomotrópico de la cloroquina también se consigue con NH_4Cl . Estos experimentos sugieren que la hormona es degradada en lisosomas ya que tanto la cloroquina como el NH_4Cl actúan a ese nivel.

Para estudiar el papel de los microtúbulos en este sistema, las células se trataron como se describió más arriba, pero esta vez con 10^{-6} M de colchicina, en lugar de la cloroquina. La colchicina es un conocido inhibidor de la actividad de los microtúbulos. En la figura 27 se observa una clara inhibición de la internalización: durante los 180 minutos analizados la hormona permaneció en la superficie celular. La curva correspondiente a la

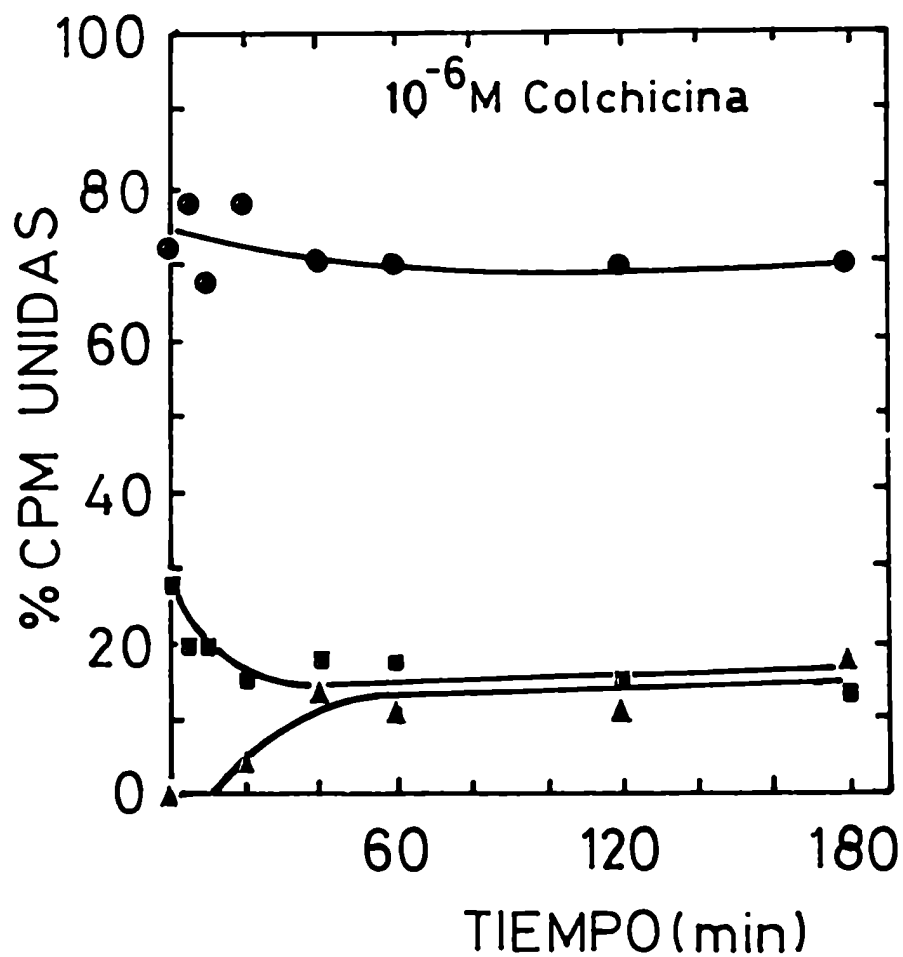


Figura 27: Cinéticas de internalización y degradación de la ^{125}I -LH en células de Leydig premarcadas y tratadas con colchicina ($1\text{ }\mu\text{M}$). Superficie (●), interior (■) y degradada (▲).

Tabla 2.- Constantes de internalización y degradación para la ^{125}I -LH en células de Levdió sometidas a distintos tratamientos.

Tratamiento	(min ⁻¹)		
	ke1	ke2	kh
Control	0.022	9.2×10^{-4}	2.9×10^{-3}
Cloroquina	0.022	1.0×10^{-4}	$< 10^{-7}$
Colchicina	-	-	$< 10^{-7}$

Estos datos corresponden al promedio de las constantes obtenidas de cuatro experimentos independientes.

degradación muestra una pequeña subida después de los 20 minutos de latencia, pero llega a una meseta a los 40. Esta aparición de productos degradados correspondió a la hormona presente inicialmente o a fenómenos de pinocitosis inespecíficos. Luego, ante la falta de hormona en el interior de la célula no hubo sustratos radiactivos para la degradación. Dadas la característica del efecto de la colchicina de bloquear el primer paso de la internalización no se pudieron en este caso calcular las constantes cinéticas.

En el segundo esquema utilizado se tomó como tiempo cero el momento en que las células, a 34°C, fueron puestas en contacto con la ^{125}I -LH. A los distintos tiempos los tubos conteniendo las células fueron procesados como en el esquema anterior. En estos experimentos, no pudo calcularse la degradación específica debido a que en el medio de incubación siempre estuvo presente la hormona marcada libre. La ventaja de este esquema es que permite analizar el comportamiento del sistema en un estado más dinámico ya que la hormona se mantiene presente en el medio extracelular, lo que en principio es más aproximado al estado fisiológico. Sin embargo, el tratamiento matemático

de este modelo es mucho más complejo ya que hay que tener en cuenta otros fenómenos como el de la asociación, la disociación, un posible reciclado de los receptores, etc.. Esto, sumado a la imposibilidad de un cálculo preciso de la hormona degradada, hace que el modelo sólo pueda ser analizado cualitativamente.

En la figura 28 se graficaron los datos de las cinéticas de internalización y degradación de la ^{125}I -hLH en células de Leydig controles. A diferencia del anterior, en este esquema la unión a membranas partió de cero y subió hasta alcanzar una meseta alrededor de los 60 minutos. En muchos casos (ver figura 30) entre los 90 y los 120 minutos apareció una nueva subida. Esto podría tener varias causas: reciclado, desenmascaramiento o síntesis de los receptores. La hormona presente en el interior también partió de cero y alcanzó un máximo entre los 40 y los 60 minutos. A partir de allí, comenzó a predominar la degradación sobre la internalización y, por lo tanto, la cantidad de hormona en el interior descendió hasta valores muy bajos en los que parece haber alcanzado un estado estacionario. En este esquema también se observó un período de latencia de unos 20 minutos para la aparición de

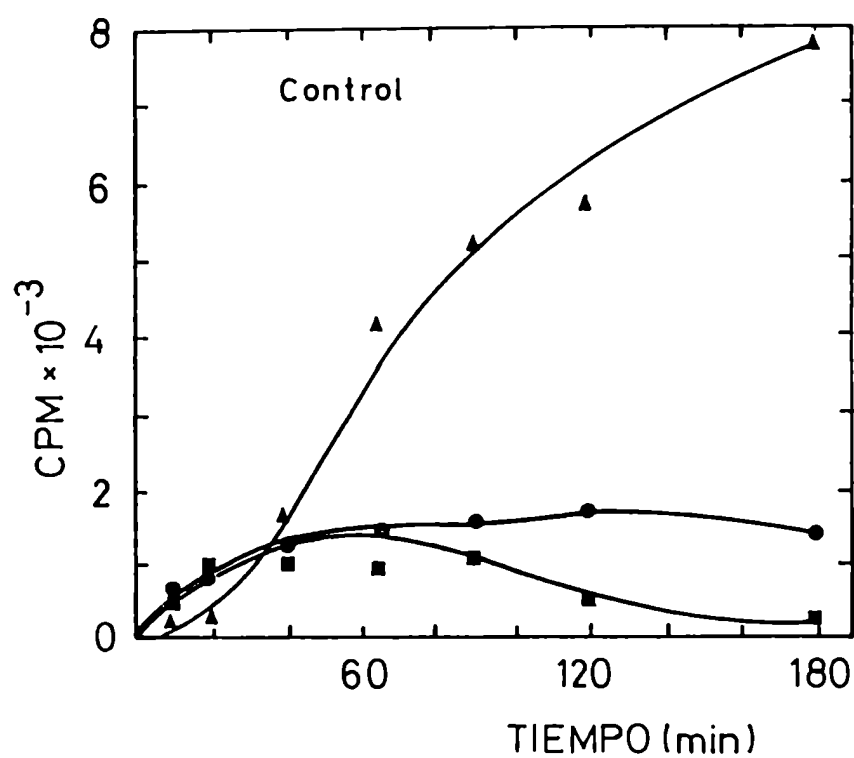


Figura 2B: Cinéticas de internalización y degradación de la ^{125}I -LH en células de Leydig. Superficie (\bullet), interior (\blacksquare) y degradada (Δ).

los productos de degradación.

Cuando las células habían sido preincubadas con 50 μ M de cloroquina durante una hora, no se ve una inhibición tan clara de la degradación (figura 29). Sin embargo, la pendiente de la curva de degradación fue mucho menor que la correspondiente a la de las células controles. Además hubo una marcada acumulación de marca en el interior de las células (casi el doble que la presente en membranas). De esto se infiere que los mecanismos de degradación son inhibidos por la cloroquina y que lo que se determinó como productos de hidrólisis de la hormona eran en realidad valores inespecíficos.

En la figura 30 se observa la acumulación de la hormona en la superficie celular, producida por el efecto de la preincubación de las células con 10^{-6} M de colchicina. Esta acumulación se puede interpretar como una consecuencia de la inhibición que produce la droga en el proceso de internalización. En este experimento se vió resaltada la segunda componente de asociación que se traduce en una subida de la curva de radiactividad en la membrana que aparece sobre la primer meseta a partir de los

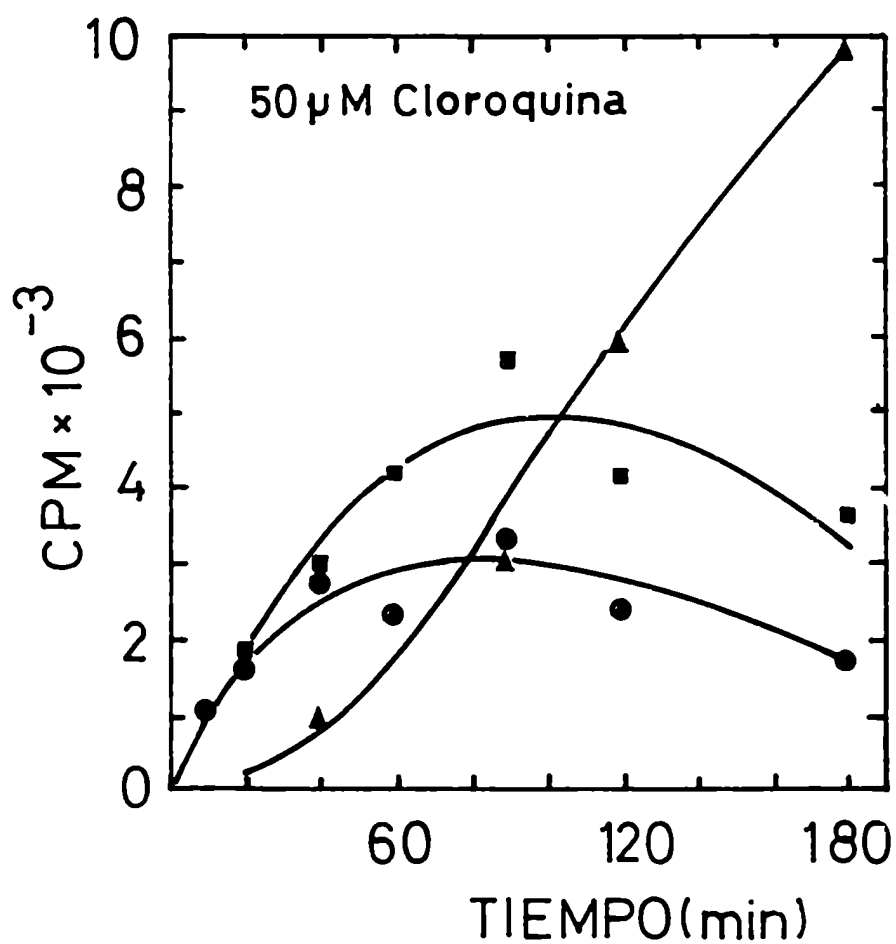


Figura 29: Cinéticas de internalización y degradación de la ^{125}I -LH en células de Leydig tratadas con cloroquina (50 μM).

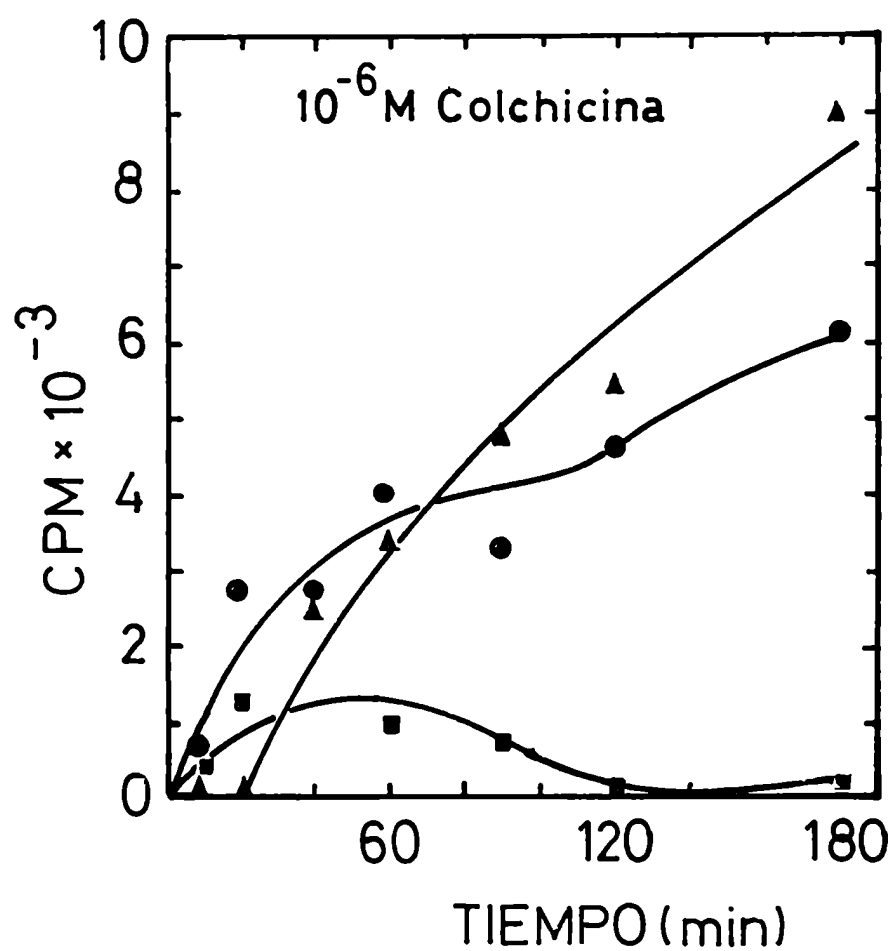


Figura 30: Cinéticas de internalización y degradación de la ¹²⁵I-LH en células de Leydig tratadas con colchicina (1 μ M).

120 minutos. Por otra parte, la colchicina no parece haber afectado el proceso degradativo ya que las pocas cuentas internalizadas desaparecieron y a los 120 minutos no hubo radiactividad en el interior.

De estos experimentos se puede concluir que las células de Leydig son capaces de internalizar la LH unida a sus membranas y que este proceso de endocitosis es bifásico. La primera componente afectaría a alrededor de un 10% de los receptores ocupados que serían rápidamente internalizados. Luego la internalización sería lenta lo que explica que tres días después de una inyección de hCG aún haya un porcentaje de los receptores ocupados por la hormona (figura 24). Este proceso de endocitosis requiere la participación de los microtúbulos. Finalmente la hormona es degradada a nivel de lisosomas y los productos de la hidrólisis son liberados al medio extracelular.

Internalización y respuesta celular

En este punto se estudiaron los efectos de algunas drogas sobre la respuesta esteroidogénica a la gonadotropina con el fin de analizar los papeles del

citoesqueleto, la internalización y la degradación en la respuesta celular.

En la figura 31 se observan las curvas de producción de testosterona en función de la concentración de hLH para células controles y preincubadas con 50 μ M de cloroquina. Se puede ver que no hubo diferencias significativas en la respuesta máxima ni en la sensibilidad a la hormona. Dado que se había demostrado que la cloroquina inhibe la degradación (figuras 26 y 29), de estos resultados se infiere que no se requiere de la degradación de la hormona para obtener una respuesta esteroidogénica normal.

Cuando se probó con un depolimerizante de los microtúbulos, la colchicina, que como se vió es capaz de inhibir totalmente la internalización de la gonadotropina (figuras 27 y 30), se obtuvieron las curvas dosis - respuesta de la figura 32. En este gráfico se observa que, tanto para la producción de AMPc como de testosterona, las curvas dosis - respuesta para las células tratadas con colchicina son perfectamente superponibles a las correspondientes a las células controles. Esto implica que la estimulación de la AC y de la biosíntesis de la

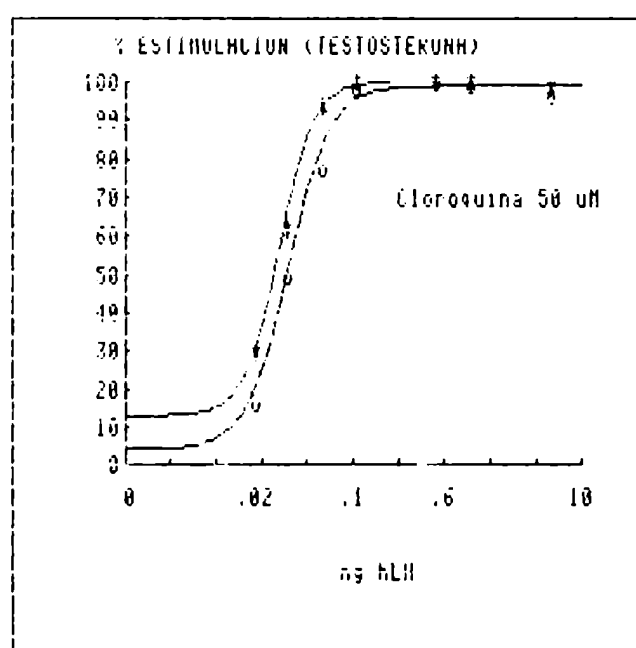
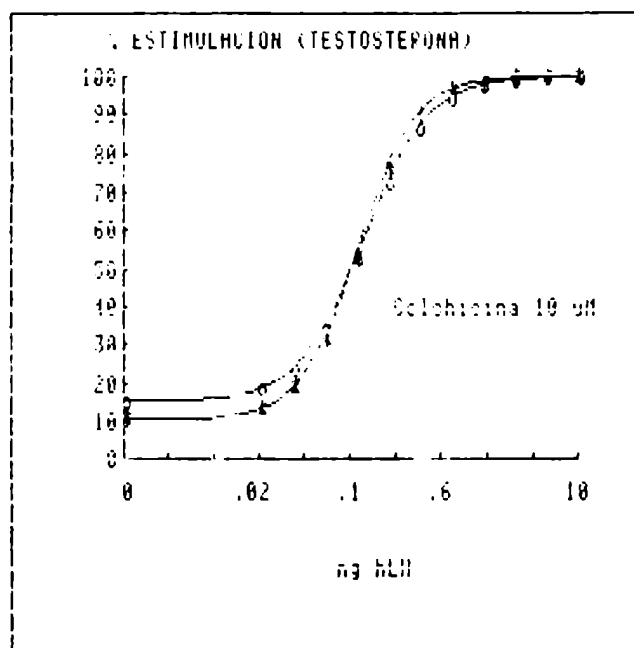


Figura 31: Curvas dosis-respuesta de células controles (o) y tratadas con cloroquina 50 uM (*).

A



B

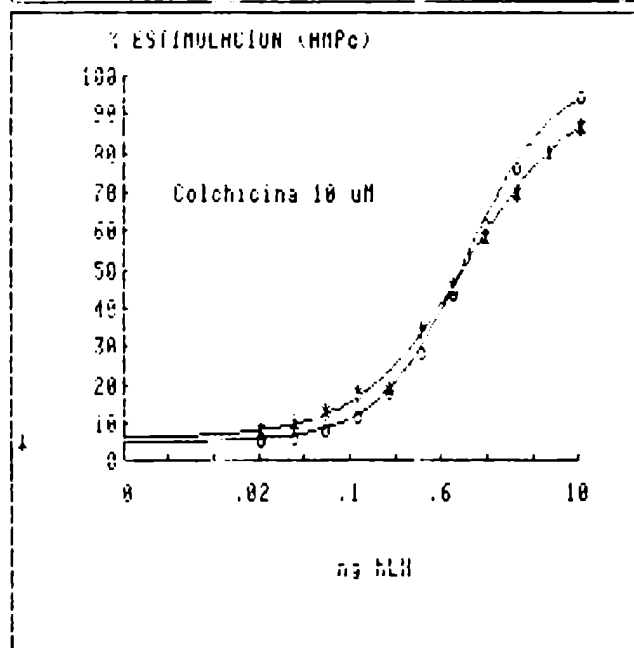


Figura 32: Curvas dosis-respuesta para la producción de testosterona (A) y AMPc (B) de células controles (o) y tratadas con colchicina 1 uM (*).

testosterona es independiente de la internalización de la hormona y no requiere de la acción de los microtúbulos.

A esta altura se contempló la posibilidad de que otro componente del citoesqueleto, los microfilamentos, estuviera involucrado en la respuesta de las células de Leydig a la LH. Para estudiar esto las células se trataron con 10 μ M de citocalasina B que es una droga depolimerizante de los microfilamentos. Las células fueron luego estimuladas con distintas cantidades de hLH durante 4 horas. En la figura 33A se dibujaron las curvas dosis - respuesta para la producción de testosterona de células controles y tratadas con citocalasina B. En este caso no hubo variación en la respuesta máxima pero la citocalasina B produjo un corrimiento de la curva hacia la derecha. Esta disminución en la sensibilidad llevó al ED50 de 0,04 nq de hLH/ml para las células controles a 0,08 nq de hLH/ml para las tratadas. Con el fin de ubicar el sitio de acción de los microfilamentos en la secuencia disparada por la LH, en los mismos preparados se determinó la producción de AMPc. La figura 33B muestra las curvas dosis - respuesta correspondientes. Se observa, aquí también, que la citocalasina B produjo un marcado corrimiento de la curva

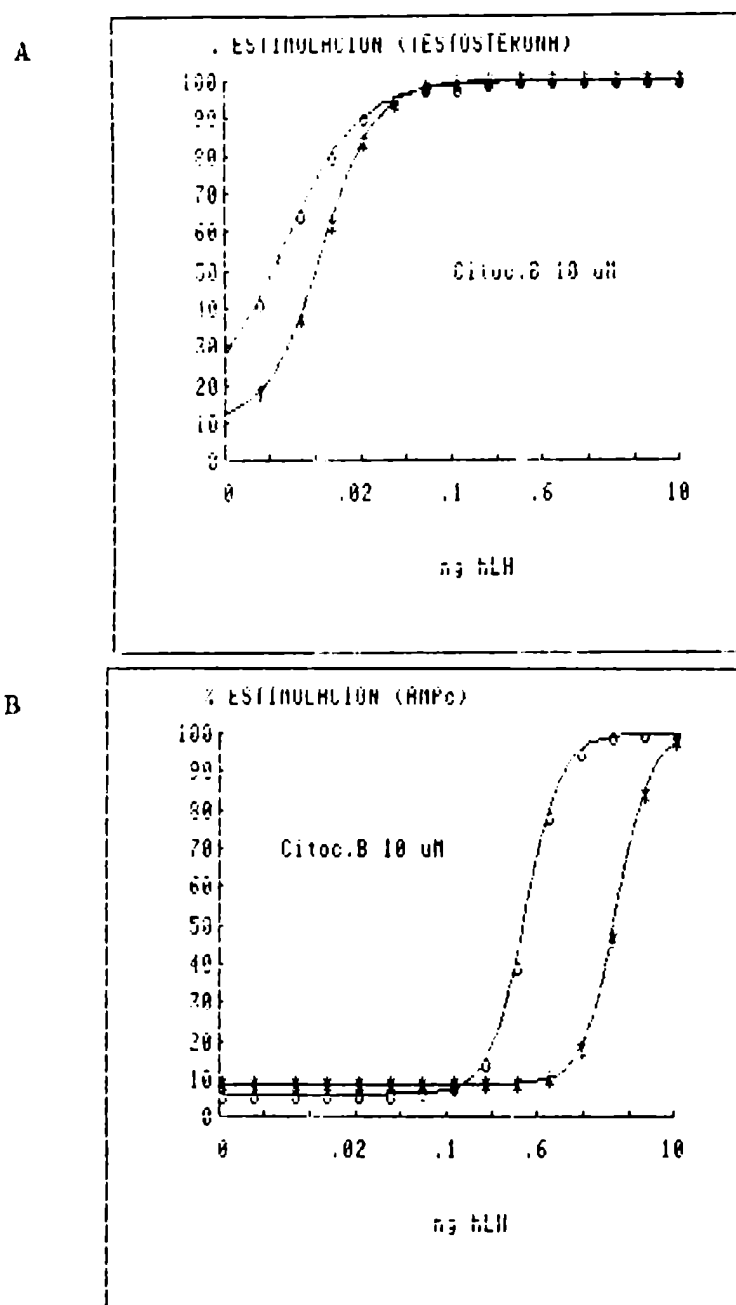


Figura 33: (A) Curvas dosis-respuesta para la producción de testosterona por células de Leydig controles (*) y tratadas con citocalasina B 10 uM (o). (B) Curvas dosis respuesta para la producción de AMPc por células controles (o) y tratadas con citocalasina B 10 uM (*).

hacia la derecha. Los ED50 (0,08 ng hLH/ml para las células controles y 5,8 ng hLH/ml para las tratadas) marcaron una diferencia mucho mayor que la resultante en la respuesta androgénica. Esto estaría indicando que la inhibición por citocalasina B en la respuesta esteroideogénica de las células de Leydig a la LH se ubicaría a nivel de la interacción del complejo hormona - receptor con la AC. Por otra parte, la estimulación con db-AMPC no se vió afectada por la droga, lo que confirmaría la intervención de los microfilamentos en la activación de la AC por hormonas.

V-Efectos nucleares de la LH

El estudio de la acción de las gonadotrofinas a nivel nuclear se centró fundamentalmente en el análisis de una posible modulación de la actividad de topoisomerasa I. En una primera etapa hubo que caracterizar esta actividad que no había sido descripta en células de Leydig.

Caracterización de la topoisomerasa I de células de Leydig

La preparación de un extracto total de células de Leydig, con una concentración de 0,5 M en NaCl, presentó una actividad capaz de relajar al plásmido superenrollado pBR 322. Esta actividad se detectó por la aparición de conformeros de relajación (topoisómeros) en un gel de agarosa 1% .

Con el fin de ubicar intracelularmente la actividad de topoisomerasa I se obtuvieron distintos extractos a partir de células de Leydig aisladas y purificadas. Para ello se separaron los núcleos de la fracción soluble. Los núcleos, purificados por gradiente de sacarosa, se extrajeron con soluciones de distinta fuerza iónica (0,15; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,5 y 2M en NaCl). En la figura 34 se graficaron

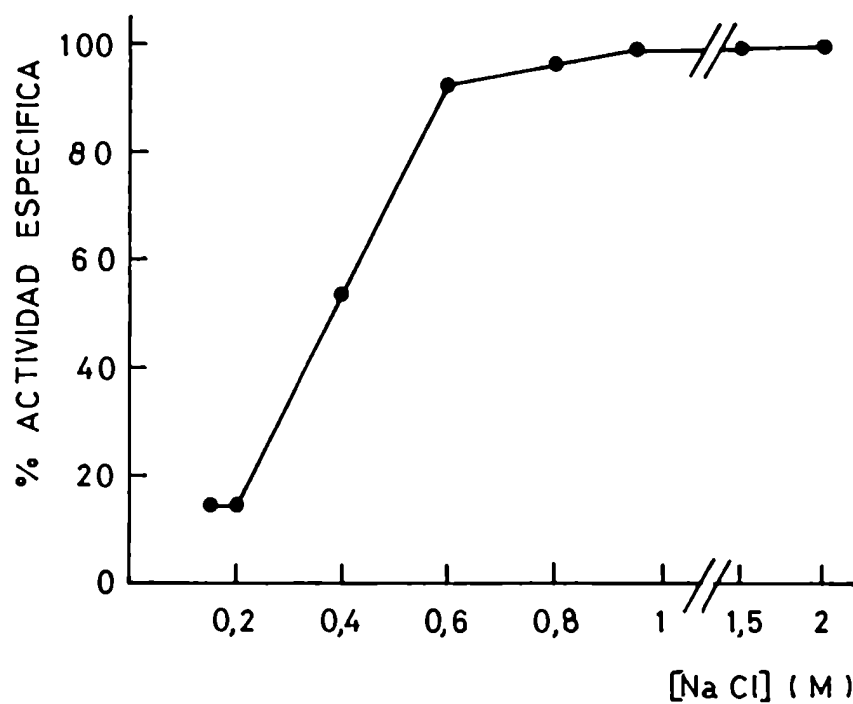


Figura 34: Actividades relativas de topoisomerasa I en función de la concentración de NaCl utilizada para la preparación de los extractos nucleares.

las actividades relativas de topoisomerasa I (expresadas como porcentaje de la máxima) en función de la molaridad del NaCl. En todos los casos los valores fueron normalizados por proteínas. Se observa que con 0,5 M de NaCl se logró extraer entre el 75 y el 80% de la actividad de topoisomerasa I. A esta fuerza iónica se solubilizan las proteínas débilmente unidas a la cromatina. El máximo de actividad se obtuvo extrayendo con concentraciones de NaCl entre 0,8 y 1 M. En la fracción soluble, en cambio, la actividad relajante, si bien estuvo presente, fue minoritaria respecto de la nuclear. Esta actividad podría incluso deberse a pérdidas de la enzima nuclear por rotura de los núcleos durante su procesamiento.

La actividad relajante analizada en estas células no requirió Mg^{++} ni ATP.

Modulación por gonadotrofinas de la actividad de topoisomerasa I

Para determinar el efecto que pudiera tener la hormona luteinizante sobre la actividad de topoisomerasa I se utilizaron dos enfoques. El primero de ellos apuntó a

revelar algún cambio acaudado en la enzima por estimulación con la hormona. Para ello se incubaron células de Leydig, aisladas y purificadas, en presencia de hLH (5 ng) o db-AMPC (1 mM) durante distintos tiempos (entre 0 y 6 horas). Al finalizar la incubación, se comprobó la acción de la hormona y del db-AMPC determinando en los medios de incubación las concentraciones de AMPC y/o de testosterona (tabla 3) respectivamente. A partir de las células previamente incubadas, se purificaron núcleos y la cromatina se extrajo con TEM 0,5. En estos extractos se determinaron las actividades relajantes, normalizadas por cantidad de proteínas. En la figura 35 se ve que no hubo variaciones significativas en la actividad de topoisomerasa I hasta las seis horas de incubación en presencia de la gonadotrofina. Tampoco se pudieron detectar diferencias cuando la actividad se determinó en extractos totales de las células de Leydig incubadas en las mismas condiciones. En la tabla 3 se asentaron las actividades específicas de los extractos nucleares.

Cuando el mismo tipo de análisis se realizó sobre células estimuladas con db-AMPC, pese a obtener una buena respuesta esteroideogénica, no hubo cambios en las

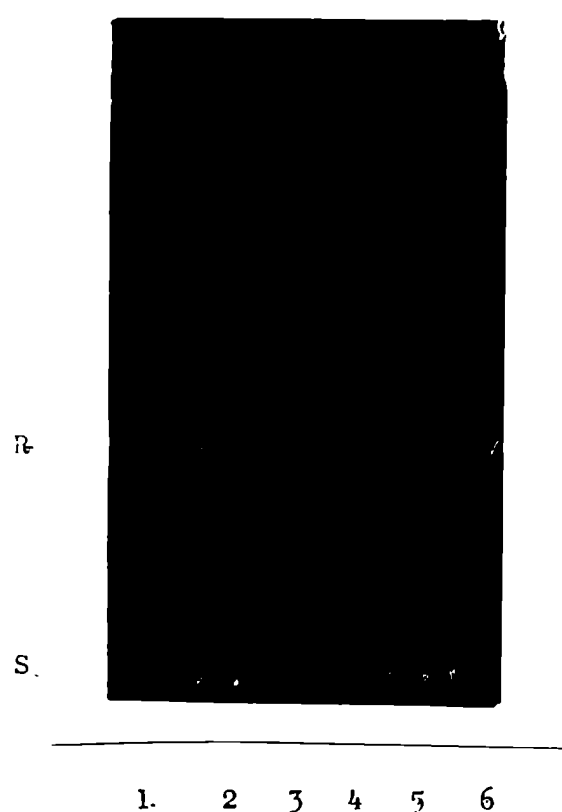


Figura 35: Gel de agarosa para la determinación de la actividad de topoisomerasa I en extractos nucleares (TEM 0,5) de células de Leydig incubadas en presencia de 5 ng de hLH durante 0, 20, 40, 60, 120 y 240 minutos (carriles 1 a 6, respectivamente).

Tabla 3.- Actividad de topoisomerasa I y producción de testosterona y AMPc por células de Leydig después de distintos tiempos de incubación con hLH.

Incubación con hLH (minutos)	0	20	40	60	120	240
Actividad nuclear de topoisomerasa I (unidades/mg proteína) $\times 10^3$	9.0	9.2	9.1	8.5	10.6	9.5
Testosterona (ng/ 10^6 cél.)	1.3	2.5	4.6	6.3	17.7	31.8
cAMP (pmoles/ 10^6 cél.)	8	120	153	209	294	371

actividades totales o nucleares de topoisomerasa I. Es interesante destacar la reproducibilidad obtenida en la extracción y la determinación de la actividad de topoisomerasa I (figura 35) pese a que se partió de grupos de células distintos.

Con el fin de analizar la posibilidad de un efecto a largo plazo de las gonadotrofinas sobre la topoisomerasa I de células de Leydig, el enfoque utilizado consistió en tratar los animales con hCG "in vivo". Las ratas, por lo menos dos por lote, fueron inyectadas con una dosis desensibilizante de hCG (200 UI) y sacrificadas distintos tiempos después del tratamiento. De cada rata, se extrajeron los testículos y se purificaron células de Leydig purificadas. Por otro lado, se verificó la acción de la hormona a través de los niveles de testosterona sérica (tabla 4). Las células de Leydig se fraccionaron según el esquema de la figura 1 y se determinó la actividad de relajación del plásmido pBR 322 en los extractos nucleares.

En la figura 36 se muestra el gel de agarosa correspondiente a un experimento representativo. En este gel se determinaron las actividades de topoisomerasa I de

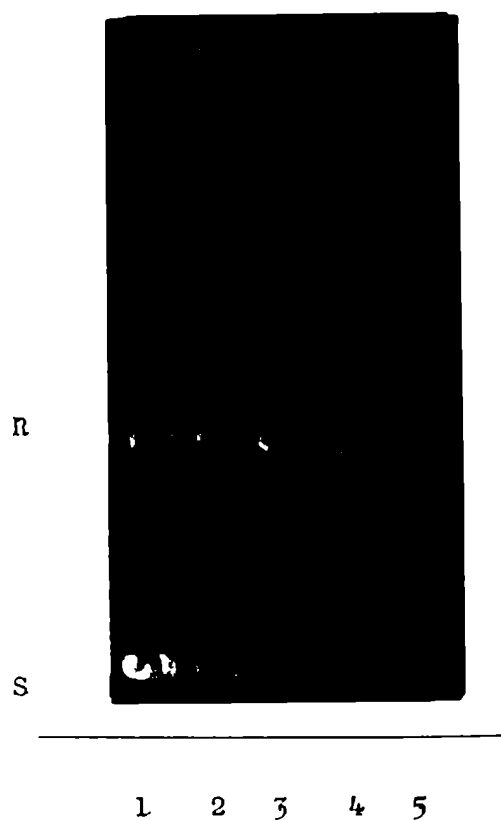


Figura 36: Gel de agarosa para la determinación de la actividad de topoisomerasa I de extractos nucleares (TEM 0.5) obtenidos 0, 12, 24 y 48 horas después de la inyección de 200 UI de hCG (carriles 2 a 5, respectivamente). Carril 1: plásmido pBR 322 superenrollado.

extractos nucleares obtenidos 0, 12, 24 y 48 horas después del tratamiento con gonadotrofina (carriles 2 al 5). 24 y 48 horas después de la inyección con hCG se vió una marcada estimulación de la topoisomerasa I. Por otro lado, no se detectaron cambios significativos en la actividad de topoisomerasa I a los 45 minutos o a las 4 horas después de la inyección (tabla 4). Este último resultado es concordante con los experimentos anteriores, realizados mediante estimulaciones "in vitro", en los cuales la LH no produjo variaciones en la actividad nuclear de topoisomerasa I durante las primeras 6 horas de estimulación.

Efectos de la gonadotrofina sobre la actividad de topoisomerasa I de distintas fracciones subcelulares

En esta etapa se estudió la posibilidad de que los efectos de la hormona sobre la enzima presentaran algún tipo de selectividad respecto de las distintas fracciones subcelulares. Para este fin, las células de Leydig estimuladas "in vitro" o "in vivo" se fraccionaron según el esquema descrito en materiales y métodos (figura 1). La actividad de topoisomerasa I se midió entonces en los

Tabla 4.- Actividad de topoisomerasa I en células de Leydig
y testosterona sérica de ratas inyectadas con hCG

Tiempo después de la inyección (horas)	0	0.75	4	12	24	48
Topoisomerasa I (unid./ mg protein) $\times 10^3$	11.6	13.2	12.1	19.8	25.5	33.3
Testosterona Sérica (ng/100 ml)	360	420	1368	745	1210	830

extractos nucleares obtenidos con distintas fuerzas iónicas y en el citosol. Esta última fracción se denominó citosol ya que se determinó previamente que una vez ultracentrifugada ($105.000 \times g$ durante 30 minutos) entre el 95 y el 100% de la actividad enzimática se recuperó en el sobrenadante.

En la figura 37 se muestran los productos de la reacción enzimática de extractos nucleares (0,5 M de NaCl) de células provenientes de animales controles (carril 1), e inyectados con hCG 24 y 48 horas antes (carriles 2 y 3 respectivamente). Se ve aquí nuevamente la estimulación inducida por el tratamiento con gonadotrofina. Cuando se obtuvieron extractos con TEM 1 a partir de los núcleos ya extraídos con TEM 0,5, se observa que el tratamiento no produce ninguna modificación en la actividad de topoisomerasa I de esta fracción (figura 37, carriles 2 al 4). Se distinguieron así dos actividades nucleares de topoisomerasa I, una susceptible de ser modulada por el tratamiento hormonal, mientras que la otra, más firmemente unida a la cromatina, no es modificable por la hormona.

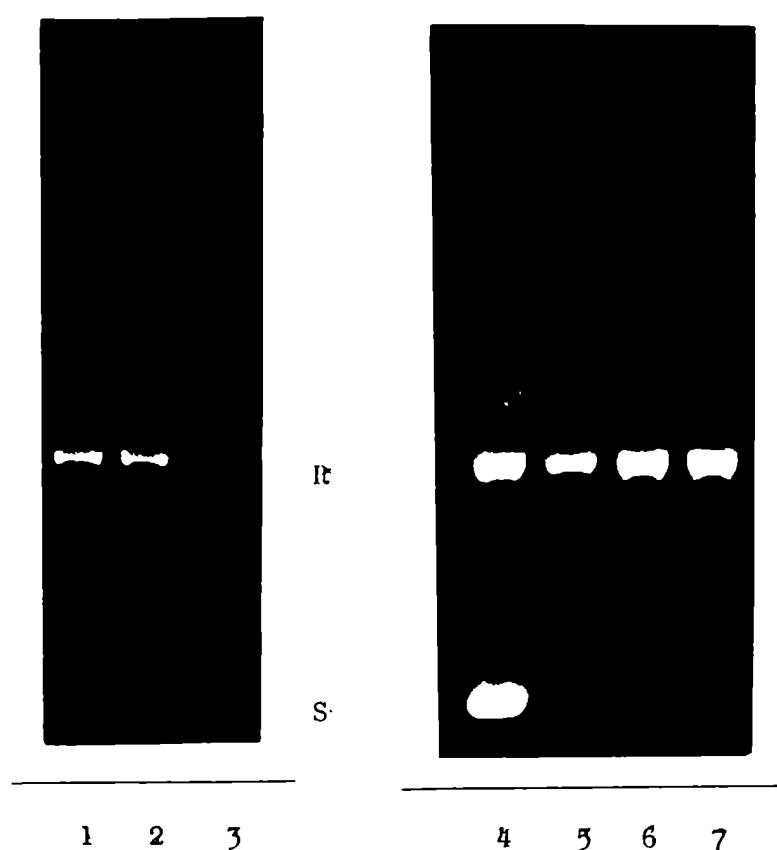


Figura 37: Gel de agarosa para la determinación de la actividad de topoisomerasa I en (A) extractos nucleares (TEM 0.5) y (B) extractos nucleares (TEM 1), 0 (carriles 1 y 5), 24 (carriles 2 y 6) y 48 (carriles 3 y 7) horas después de la inyección de 200 UI de hCG. Carril 4: pBR 322 superenrollado.

Ya se había visto que la LH no era capaz de modificar la actividad nuclear de topoisomerasa I en células de Leydig en suspensión (figura 35). En otro experimento, también realizado con células en suspensión estimuladas con LH "in vitro", se estudió la actividad de topoisomerasa presente en el citosol. La figura 38 muestra el resultado de la medición de la actividad enzimática en la fracción soluble de células de Leydig incubadas en presencia de hLH (5 ng) durante 0, 20, 40, 60, 120 y 240 minutos (carriles 1 al 6, respectivamente). Se observa que después de cuatro horas de estimulación con la gonadotrofina hubo un ligero incremento en la actividad de topoisomerasa I de esta fracción (carriles 5 y 6).

En la figura 39 se observa un gel de agarosa correspondiente a la determinación de actividad soluble de topoisomerasa I de células de Leydig de animales tratados con hCG. Los tiempos analizados fueron 0, 6, 24 y 48 horas. Con este esquema se ve que hay una caída de la actividad citosólica a las 24 y 48 horas, coincidente con la estimulación de la actividad medida en extractos nucleares (figuras 36 y 37).

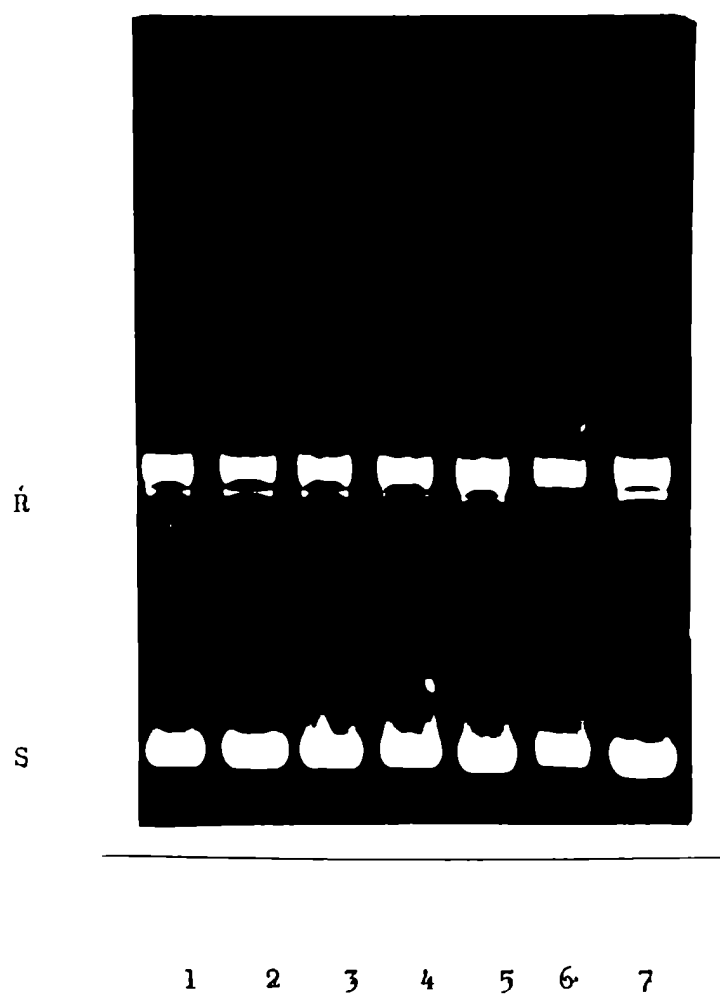


Figura 38: Gel de agarosa para la determinación de la actividad de topoisomerasa I en citosol de células de *Levdiq* incubadas durante 0, 20, 40, 60, 120 y 240 minutos (carriles 1 a 6, respectivamente). Carril 7: plásmido pBR 322 superenrollado.

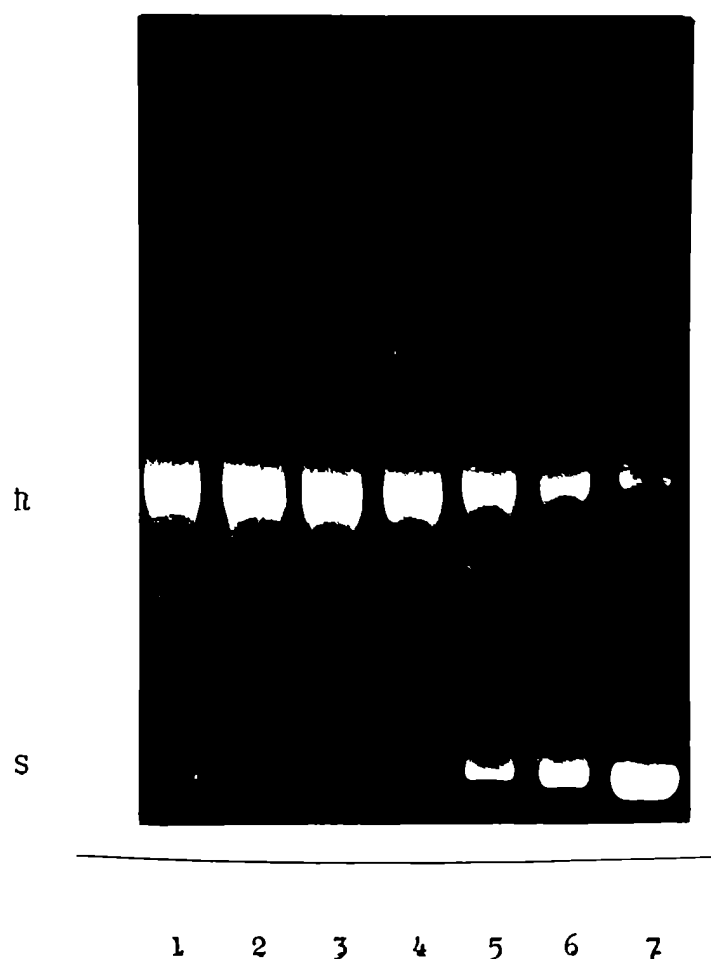


Figura 39: Gel de agarosa para la determinación de la actividad de topoisomerasa I en citosol de células de Leydig obtenidas de animales inyectados 0, 2, 6, 12, 24 y 48 horas antes (carriles 1 a 6). Carril 7: plásmido pBR 322 superenrollado.

Estos experimentos sugieren que la hormona luteinizante provocaría una estimulación secuencial de la actividad soluble y la nuclear de topoisomerasa I, sin afectar, por lo menos en los tiempos estudiados, una tercera fracción que se hallaría más internalizada en la cromatina.

Efecto del AMPc sobre la actividad de topoisomerasa I

Para analizar este punto se prepararon extractos totales de células de Leydig purificadas. En estos preparados se verificaron las presencias de la actividad de topoisomerasa I y la capacidad de unión de AMPc a fracciones proteicas. Después de preincubar los extractos durante 20 minutos en presencia o en ausencia de 1 mM AMPc se estudió la cinética de la actividad de topoisomerasa I en los mismos. La figura 40 muestra como, para los distintos tiempos de incubación estudiados, siempre es mayor la cantidad de plásmido relajado por el extracto preincubado con AMPc que por el control. Otros nucleótidos como el GMPc o el ATP no presentan ningún efecto sobre la actividad enzimática de estos extractos.

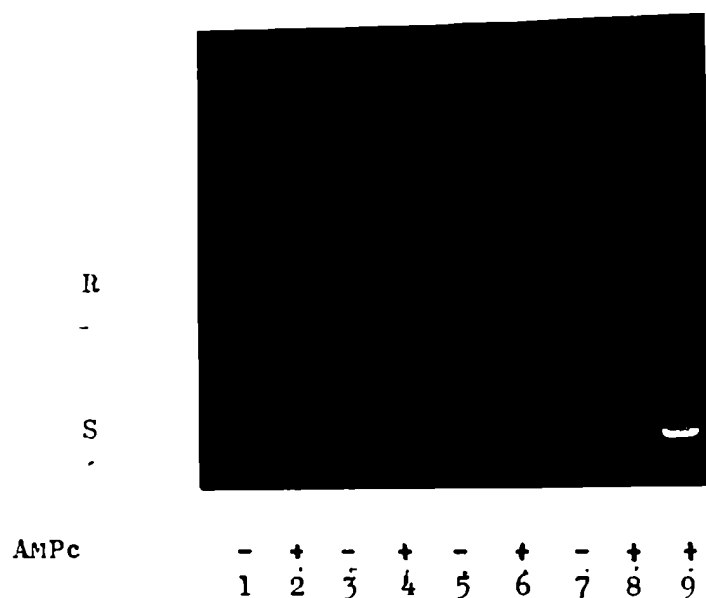


Figura 40: Gel de agarosa para la determinación de la cinética de la actividad de topoisomerasa I en extractos totales de células de Leydig preincubados durante 20 minutos en presencia (+) o en ausencia (-) de AMPc 1 mM. Los tiempos estudiados fueron 5 (carriles 7 y 8), 10 (carriles 5 y 6), 15 (carriles 3 y 4) y 30 (carriles 1 y 2) minutos. Carril 9: plásmido pBR 322 superenrollado.

Cuando el extracto total, previamente estimulado con AMPc, fue tratado con fosfatasa alcalina durante 10 minutos a 34°C se observó una clara inhibición de la actividad de relajación, inclusive llevándola a niveles menores que los del extracto control (figura 41A). Por otro lado el AMPc fue incapaz de modificar la actividad de topoisomerasa I de extractos nucleares. Además la presencia de un inhibidor de la PK dependiente de AMPc durante la preincubación con AMPc impidió la estimulación descrita (figura 41B).

Todos estos datos sugieren un mecanismo de fosforilación, en el que intervendría la PK dependiente de AMPc, como mediador de la estimulación de la topoisomerasa I por hormonas proteicas.

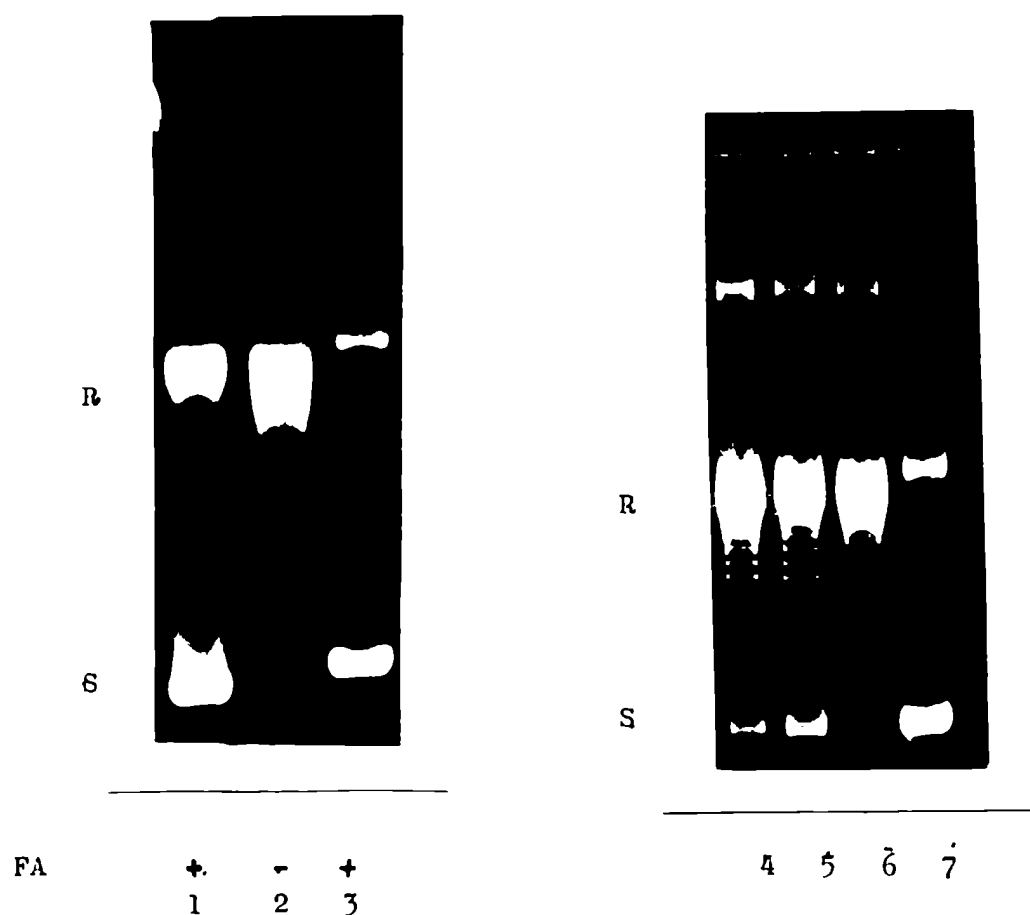


Figura 41: Gel de agarosa para la determinación de la actividad de topoisomerasa I en: A.- extractos totales preincubados durante 20 minutos en presencia de AMPc y luego incubados 10 minutos con (+) y sin (-) fosfatasa alcalina; B.- extractos totales preincubados durante 20 minutos en presencia (carriles 6 y 4) o ausencia (carril 5) de AMPc y con (carril 4) o sin (carriles 5 y 6). Carriles 3 y 7: plásmido pBR 322 superenrollado.

DISCUSION

La acción de las hormonas proteicas en sus células blanco lleva implícita una serie de etapas que van desde el reconocimiento de la hormona hasta la activación de genes específicos. En este estudio se ha intentado aclarar algunos de estos pasos utilizando como modelo la acción de LH sobre las células de Leydig del testículo. La gonadotrofina tiene en estas células dos tipos de efectos: algunos son agudos y tienen como principal fin la estimulación de la biosíntesis y la secreción de andrógenos y otros, de índole trófica indispensables para el mantenimiento de este tejido esteroidogénico. Esto hace del modelo un sistema interesante para el estudio de los diversos mecanismos disparados por la acción de una hormona proteica.

Es bien conocido el papel fundamental que desarrollan los receptores en la acción hormonal. Tanto los receptores citoplasmáticos como los de membrana presentan propiedades

de reconocimiento de la hormona por un lado y de activación de la respuesta celular por el otro. Esta dualidad pone de manifiesto el carácter de eslabón esencial de un receptor en la serie de fenómenos que desencadena una hormona. La primera parte de esta tesis se enfocó en el análisis de la etapa de reconocimiento entre la hormona y su receptor.

La herramienta que permitió el descubrimiento de los receptores hormonales y que se ha transformado en la fundamental en el estudio de la interacción hormona - receptor es el uso de ligandos marcados radiactivamente. Para obtener datos reproducibles y que puedan ser comparados por distintos laboratorios es necesario conocer la actividad específica del compuesto radiactivo. Hasta ahora, la mayoría de los laboratorios obtenían el dato de la actividad específica de las hormonas peptídicas, marcadas con iodo radiactivo, a partir de los pasos de purificación del ligando iodado. Sin embargo, ese método suele acarrear errores porque, como ha sido demostrado por Cresto y col. (206), el proceso de iodación puede dar proteínas monoiodadas así como moléculas con dos o sin ningún iodo. La actividad específica así obtenida corresponde, entonces, a un promedio de distintas especies

que no presentan la misma actividad biológica. Además, se comprobó (207,208) que la iodación de hormonas como la LH produce una variedad de compuestos marcados además de la hormona. A estos inconvenientes se suma el hecho que, dados los fenómenos de radiolisis y transcurrido un cierto tiempo después del cálculo inicial de la actividad específica, ya no basta una corrección por decaimiento del radioisótopo para obtener un valor correcto (209).

Para obtener un valor de actividad específica más realista, otros autores (210,211) han utilizado una técnica de autodesplazamiento. En estos casos se asume que la masa del trazador en la solución radiactiva es igual a aquella que presenta la misma relación unido/libre (B/F) que la hormona fría en un gráfico de B/F versus log [masa (ng) de hormona fría o volumen (ul) de solución de hormona marcada]. Esta suposición es válida siempre y cuando la masa del trazador sea despreciable frente a la hormona fría agregada, como resulta de los estudios aquí presentados.

En este trabajo se modificó la técnica y se la completó con el fin de hacerla aplicable a cualquier liqando para el cual se cuente con un aceptor. Se

introdujo con ese fin el concepto de máxima capacidad de unión y un método para su determinación. Esta técnica es especialmente útil en el caso de las hormonas proteicas para las que los métodos de marcación son bastante inespecíficos y agresivos, lo que suele afectar profundamente la actividad biológica de la hormona marcada. Utilizando esta técnica los valores de actividad específica se obtienen justamente a partir de la actividad biológica que se desea estudiar (en este caso la de unión al receptor). Podría también aplicarse determinando las respuestas biológicas de células enteras.

Una vez desarrollada la técnica de autodesplazamiento se pudo entonces encarar el estudio de la interacción hormona - receptor. La primera etapa consistió en analizar la asociación del ligando al receptor. Para poder calcular las constantes cinéticas de asociación se tuvo en cuenta no sólo la hormona pegada a la superficie de la célula sino también aquella que, a cada tiempo, hubiera sido internalizada y degradada. De este modo se tendría un panorama de la unión de la hormona a sus receptores en condiciones más parecidas a las fisiológicas. Al realizarse la unión en células enteras se permite que se

lleve a cabo el procesamiento completo de la hormona, con las modificaciones que esto puede acarrear sobre la primera interacción de la hormona con la membrana plasmática. Utilizando esta aproximación se calculó la energía de activación del proceso de asociación. El valor de 12,4 kcal/mol indica que esta reacción es muy rápida ya que la barrera energética a superar es baja. Esto, junto a la alta afinidad, parece ser una característica importante del reconocimiento hormona - receptor ya que permite que muy pequeñas concentraciones del ligando sean capaces de desencadenar respuestas rápidas como es el caso de la estimulación esteroidogénica en las células de Leydig.

El estudio de la disociación, llevado a cabo sobre membranas de testículo (fig. 9), reveló la presencia de dos componentes cinéticos distintos. Durante los primeros 10 ó 15 minutos iniciales, a 34°C, hay una disociación rápida seguida por un proceso muy lento. Aún después de tres horas, un 50% de la hormona permanece unida a la membrana. Esto plantea básicamente tres opciones: 1) la formación de agregados de receptores, previa a la internalización, lo que disminuiría la reversibilidad de la reacción (105); 2) la presencia de dos tipos de sitios de

unión. nunca demostrada pero sí sugerida (213); v 3) la aparición de nuevos receptores.

Un análisis en el equilibrio según Scatchard presentó un grafico curvo. Descartada la posibilidad de un fenómeno de cooperatividad negativa por el experimento de disociación, se puede inferir la existencia de dos tipos de receptores: uno de alta afinidad y baja capacidad y otro de baja afinidad y una capacidad moderada. Es de notar que el valor hallado para la primera constante de afinidad está de acuerdo con el encontrado en la literatura (210). Es muy probable que el uso de una hormona marcada con alta actividad específica impida ver el segundo sitio. Generalmente se puede encontrar en la literatura que la actividad específica utilizada está alrededor de los 40-50 uCi/uq. En este caso se utilizó una hormona que poseía una actividad específica de 2.84 uCi/uq. con lo que se pudo aumentar la cantidad de radiactividad agregando suficiente cantidad de hormona fría.

La posibilidad de un desenmascaramiento de receptores está avalada por una serie de observaciones. Ya se mencionó que existe una regulación positiva inicial de los

receptores (102,104) que no depende de la síntesis de proteínas (105). Además, recientemente se han presentado evidencias de la existencia de poblaciones enmascaradas de receptores para gonadotrofinas en el cuerpo lúteo (214). La aparición de estos receptores parece estar correlacionada con procesos de modulación de la fluidez de la membrana (215). Este fenómeno, como la irreversibilidad de la unión del ligando al receptor, podría estar relacionado con la terminación de la acción hormonal y favorecer procesamientos posteriores del complejo hormona - receptor, inclusive el reciclado del receptor (96). En los experimentos de internalización también se manifiesta la presencia de dos tipos de receptores. En este caso se diferencian por las distintas velocidades con que son endocitados. Esto llevó a definir dos constantes de internalización. Sin embargo esto parece ser independiente de un posible reciclado de los receptores ya que, en los experimentos con colchicina, en los que la endocitosis está fuertemente inhibida, se observa una marcada subida en la curva de unión a la membrana, alrededor de los 90 minutos (fig. 30). Es probable entonces que, en la situación fisiológica (fig. 25 y 28) los fenómenos de regulación

positiva y de internalización tiendan a compensarse.

Quando se estudió hasta qué punto la internalización era responsable de la desaparición de los receptores en las células desensibilizadas, se vió (fig 24) que 72 horas después de la inyección de 200 UI de hCG un 35% de los sitios de unión originales se hallaban aún en la membrana, aunque ocupados. Sólo una segunda dosis de gonadotrofina fue capaz de eliminar casi todos los receptores de la superficie. Estos resultados concuerdan con los de otros autores (216) que demostraron, mediante técnicas inmunohistoquímicas, que la unión de la hCG a células de Leydig porcinas, en cultivo, tiende a ser irreversible y que la desaparición del complejo hormona - receptor de la superficie es muy lenta. Otros experimentos, realizados "in vivo", indican la presencia del complejo hormona receptor en la superficie de las células de Leydig de rata hasta 48 horas después de la inyección de hCG (20,217,218). En algunos de estos casos (216), se ha probado que muchos de los complejos remanentes en la membrana son los originales, lo que concuerda con la baja velocidad de disociación aquí descrita. Esto parece descartar la posibilidad de que la síntesis "de novo" o el reciclado de

los receptores sean la causa principal de la presencia de los complejos en la membrana.

Es de esperar entonces que la velocidad de internalización tenga un papel determinante en estos fenómenos. Los resultados presentados aquí indican una internalización muy lenta de la LH en células de Leydig. Pese a que un pequeño porcentaje de la hormona unida a la membrana es rápidamente endocitada, el resto presenta una velocidad de internalización mucho menor. Estos resultados son concordantes con los derivados de estudios morfológicos tanto "in vivo" como "in vitro" en células luteales o de la granulosa (217,88). Ahmed y col. (219) sugieren que, en células luteales, los complejos hCG - receptor son internalizados más rápidamente que las demás proteínas de membrana. Sin embargo, otros estudios (220) demostraron que ciertas proteínas marcadas presentaban velocidades de internalización hasta 100 veces menores que el resto de las proteínas de la membrana. Robinson y col. (221) demostraron que el complejo hCG - receptor tiene una velocidad de internalización, en células de la granulosa, entre siete y nueve veces menor que la del promedio de las proteínas de membrana. La constante de internalización que

se encontró aquí para la LH en células de Leydig es del mismo orden que la informada por Robinson y col.. Estas bajas velocidades podrían explicarse por una exclusión selectiva de los complejos hormona - receptor respecto de los pozos recubiertos (88,222). Estos datos difieren, sin embargo, de los resultados obtenidos con células de Leydig tumorales (110), lo que podría estar reflejando las diferencias entre las células normales y tumorales.

Existen numerosas evidencias del papel de los microtubulos en los mecanismos de internalización (223). Los resultados de los experimentos con colchicina (fig. 27 y 30) muestran que esta droga inhibe fuertemente la internalización de la LH en células de Leydig. La colchicina produce serias alteraciones en el sistema de microtubulos, lo que indica que la endocitosis del complejo LH - receptor en estas células involucra la acción de estos elementos del citoesqueleto. Este resultado, si bien nuevamente contradice los presentados por Ascoli en células tumorales (110), ha sido recientemente confirmado por estudios "in vivo" con esta droga, así como con vinblastina, otro inhibidor de los microtubulos (214). En otros sistemas, la colchicina impide la transferencia de la

125 I-Pr1 internalizada a la fracción del Golgi, pero no interfiere en la internalización en si. En las células de Leydig en cambio, se demostró aquí, que es la primera etapa, la de internalización, la que se inhibe por acción de la colchicina. Quedaría aún por determinar si estos inhibidores de los microtúbulos interfieren en los pasos posteriores de procesamiento del complejo hormona - receptor. Por lo pronto, ni la vinblastina ni la colchicina impiden el aumento de los niveles de testosterona plasmática después de la inyección de hCG (214), como tampoco la colchicina es capaz de afectar la sensibilidad ni la magnitud de la respuesta esteroidogénica de células de Leydig en suspensión (fig. 32). Esto indica que la colchicina no presenta efectos tóxicos sobre las células de Leydig. Otra conclusión interesante es que la acción de los microtúbulos, fundamental para la internalización, no es necesaria para una respuesta esteroidogénica normal.

Existe un consenso generalizado en que las hormonas peptídicas internalizadas por las células blanco son finalmente degradadas en los lisosomas. La mayor parte de las evidencias son indirectas ya que en general los

productos de degradación difunden y por lo tanto son muy difíciles de fijar. Por eso ha sido de gran utilidad el uso de agentes lisosomotrópicos como la cloroquina y el NH Cl. En las células de Leydig ni la cloroquina (fig. 26 y 29) ni el NH Cl afectan al proceso de internalización en si pero inhiben la aparición de productos de hidrólisis de la hormona con la consecuente acumulación de marca radiactiva en el interior de las células. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ascoli y Puett en células tumorales (110,111). Los resultados aquí presentados confirman la hipótesis de que la hormona unida a las células de Leydig, después de ser endocitada, es degradada en los lisosomas y los productos de la hidrólisis son liberados al medio extracelular. Este proceso de degradación presenta un periodo de latencia de unos veinte minutos lo que se podría explicar por el tránsito vesicular que requiere la hormona para llegar a los lisosomas (223). En las células tumorales, Ascoli (111) encontró que la cloroquina, en concentraciones similares a las usadas aquí, inhibe parcialmente la esteroidogénesis activada por gonadotrofinas. el experimento presentado en la figura 31 demuestra que la cloroquina no afecta la

sensibilidad ni la respuesta máxima de las células de Levdiq a la LH. De esto se deduce también que la degradación de la LH no está relacionada con la estero-dogénesis estimulada por la hormona, hecho que también fue probado por Ascoli en su sistema (112) mediante otra estrategia experimental.

Se mencionó que no es necesaria la integridad de los microtúbulos para obtener una respuesta esteroideogénica normal. En cambio, cuando se ensayó el efecto de la citocalasina B, se vió que esta droga depolimerizante de los microfilamentos disminuye la sensibilidad de la respuesta androgénica (figura 33). En la parte B de esa figura se demuestra que esa inhibición es reflejo de una inhibición mucho más marcada de la producción de AMPc estimulada por LH. Esto lleva a postular un papel de los microfilamentos en la interacción receptor - AC. Existían evidencias de que la citocalasina B, así como los anticuerpos anti-actina (principal componente de los microfilamentos), era capaz de evitar la estimulación de la producción de AMPc por LH en ovario, sin afectar la unión de la hormona (225). Una de las explicaciones más adecuadas para esto es que los microfilamentos intervienen

en la movilidad lateral de los receptores, permitiendo así la interacción con los demás componentes de la membrana, entre ellos la proteína N. Es interesante notar que, al igual que en el ovario (225), en células de Leydig los microfilamentos y no los microtúbulos son los componentes del citoesqueleto relacionados con la activación de la AC mientras que en la mayoría de los demás sistemas sucede lo contrario (226). Otro punto llamativo es que Hall y col. (227) encontraron en células de Leydig que los anticuerpos anti-actina inhibían la esteroidogénesis estimulada por LH pero no la producción de AMPc. Los autores postulan que el paso dependiente de los microfilamentos es el transporte de colesterol hacia la mitocondria. Esto debería ser probado de un modo más directo, pero abre la posibilidad de que la citocalasina B tenga un efecto tóxico sobre la actividad de la AC.

El fenómeno de resensibilización de las células de Leydig fue inicialmente descrito por Calvo (140). En sus trabajos, continuados luego en esta tesis, se observó que una inyección de hCG aplicada a animales previamente desensibilizados no lograba inducir un nuevo ciclo de

desensibilización. En este estado, el número de receptores para LH permanece muy bajo (fig. 13 y 24) y, sin embargo, los testículos son capaces de responder a la estimulación con la gonadotrofina con una producción de testosterona superior a la inducida por la hormona en testículos de animales controles (fig. 14). Además, la segunda dosis de hCG es capaz de acelerar la reversión de los bloqueos enzimáticos revelados por la acumulación de productos intermediarios de la esteroidogénesis. Aun siete días después de la primera inyección de hCG, una segunda dosis no pudo volver a desensibilizar las células de Leydig (fig. 15 y 16). Esto sugiere que, de algún modo, la primera inyección de la hormona, además de desensibilizar a las células, provoca cambios perdurables en las mismas. La aparición de un segundo pico en los valores basales de testosterona plasmática, ya mencionado por otros autores (114,229) permite postular que a los tres días de la administración de hCG, las células ya están saliendo del estado de desensibilización. Esto se refleja en los altos valores basales de testosterona cuando se incuban los testículos o las células aisladas. La producción del esteroide estaría mantenida por la hormona que, 72 horas

después de la inyección, permanece unida a la membrana celular (fig.24). La segunda inyección, no sólo no produce una nueva desensibilización, sino que acelera la resensibilización de las células. Estos resultados indican que la desensibilización producida por una inyección de hCG es un evento temporal, lo que concuerda con los efectos de tratamientos crónicos con gonadotrofinas en ratas (147,139) y en la experiencia clínica (136,137).

La demostración de que la inyección de hCG tenía efectos disimiles en las actividades enzimáticas de tres poblaciones de células de Leydig (147) llevó a investigar el efecto de una segunda inyección sobre esas poblaciones. En el fraccionamiento de las células obtenidas por tratamiento con colagenasa se distinguen cuatro bandas con capacidad de unir LH. La banda O está constituida por restos celulares (143,230) y prácticamente no responde a la gonadotrofina. Las bandas IA, IB y II corresponden a las descritas por Payne y col. (142). Se demostró aquí que, 72 horas después de la administración de una o dos dosis de hCG, prácticamente no se detectan sitios de unión para LH en ninguna de las tres poblaciones. El estudio de la capacidad esteroideogénica de los distintos tipos celulares

mostró que todas las poblaciones son desensibilizadas por una dosis de 200 UI de hCG. Por otro lado, la segunda inyección de la hormona induce el estado de resensibilización en todas las poblaciones. Esto se manifiesta por la reversión de los bloqueos enzimáticos y la recuperación de la respuesta esteroideogénica a la estimulación "in vitro" con LH, pese a que existe una marcada disminución de la sensibilidad.

El comportamiento homogéneo de las distintas poblaciones de células de Leydig frente al tratamiento con hCG está de acuerdo con trabajos recientes de Aquilano y Dufau (230) y de Laws y col. (231) que, mediante ensayos morfológicos y bioquímicos, demostraron que la aparición de poblaciones más livianas de células de Leydig está relacionada con la presencia de células sin núcleo o dañadas. En principio se descartaría entonces la existencia de poblaciones de células de Leydig funcionalmente distinguibles, considerándose inclusive que la separación física de estas poblaciones sería consecuencia de los daños producidos sobre las células durante su obtención.

Una posible explicación para el fenómeno de resensibilización se entronca con las conclusiones obtenidas por Hodgson y de Kretser (229). Estos autores encuentran, como aquí, que el estado desensibilizado producido por una inyección de hCG no puede ser mantenido mediante nuevas administraciones de gonadotrofina. La ausencia de un nuevo período refractario se puede relacionar con la acción trófica que ejerce la gonadotrofina sobre las células de Leydig. Este tipo de acción se refleja, por un lado, en un aumento del número de células en ratas adultas tratadas crónicamente con hCG (135). Por otra parte, Ewing y Zirkin (232) demostraron una muy buena correlación entre el desarrollo del retículo endoplásmico y la función esteroidogénica. Sus estudios de microscopía electrónica demostraron que uno de los efectos tróficos de la LH es la regulación de la biogénesis y el reciclado del retículo endoplásmico liso. La primera inyección de hCG dispararía el desarrollo de una maquinaria esteroidogénica con una capacidad incrementada. Teniendo en cuenta que las enzimas involucradas en la conversión de pregnenolona a testosterona se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico, esta nueva maquinaria sería

responsable de la reversión de los bloqueos enzimáticos de la esteroidogénesis, acelerada por la segunda dosis.

Un hecho interesante es que, como se ve en las figuras 14 y 16, la respuesta en testosterona de las células resensibilizadas no está asociada a un aumento significativo de la producción de AMPc. Surgió entonces el interrogante sobre el papel del AMPc en la respuesta a la LH de las células resensibilizadas. Para determinar si el estímulo de la producción de testosterona está o no mediado por AMPc se trabajó con células de Leydig totales en virtud de lo mencionado anteriormente. Cuando se midió la producción de testosterona de las células de Leydig resensibilizadas en función de la concentración de hLH, se observó un marcado corrimiento hacia mayores concentraciones de la curva dosis - respuesta para estas células respecto de las correspondientes a las células controles (fig 20). En este punto fue interesante investigar si existía alguna relación entre la disminución en la sensibilidad y la baja producción de AMPc. La realización de curvas de producción de testosterona en función de la concentración de db-AMPc mostró que no hay diferencias en la sensibilidad entre las células controles

resensibilizadas cuando son estimuladas por el nucleótido. Esto indicaría que el AMPc puede ser mediador de la respuesta esteroideogénica a la gonadotropina en el estado resensibilizado. Los cambios encontrados en la sensibilidad serían debidos, entonces, a alteraciones previas a la activación de la PK.

Por otra parte, la ocupación de los sitios de unión intracelulares para AMPc que se encuentra en el estado resensibilizado,⁴ indica que hay un aumento en la producción del nucleótido cíclico en respuesta a la estimulación con LH, aunque en concentraciones tan bajas que no permiten su detección en el medio extracelular. Sin embargo, estos niveles de AMPc podrían ser suficientes para activar la síntesis de testosterona. Otros trabajos (30,126) han sugerido una compartimentalización funcional en las respuestas mediadas por AMPc y la PK y postularon que la fracción de AMPc necesaria para la activación celular tiene un acceso más directo a los receptores relacionados con la modulación de las enzimas claves de la esteroideogénesis.

Dado que el ED50 de la estimulación con db-AMFc no es modificado por el tratamiento resensibilizante, pese a la menor sensibilidad de la respuesta a la hormona, se puede postular que este corrimiento en la sensibilidad se debe a una menor producción de AMFc, reflejada en la ocupación de los sitios intracelulares para el nucleótido. La menor producción de AMFc durante la estimulación con LH de las células de Leydig resensibilizadas puede estar relacionada con la falta de receptores para LH presentes en la membrana. Los resultados presentados muestran que células que han recuperado parcialmente sus receptores son capaces de responder a la LH pero presentan una sensibilidad intermedia entre la de las células controles y las resensibilizadas. Esto estaría indicando una correlación entre el número de receptores disponibles y la sensibilidad de la respuesta androgénica.

Ha sido ya demostrado (28) que se obtiene en células de Leydig una respuesta esteroidogénica máxima con la ocupación de un 1% de los receptores para LH. Por otra parte, existe una clara correlación entre la unión a membranas de Gpp(NH)p inducida por la hormona y la activación de la AC y, además, la cantidad de moléculas del

nucleótido que se unen a la membrana es considerablemente mayor que el número de sitios de unión para LH. Todos estos datos, unidos a los encontrados en este trabajo sobre la unión y la internalización de la LH y sobre la sensibilidad de la respuesta después de los distintos tratamientos con hCG, permiten plantear un modelo para la primera etapa del mecanismo de acción de la gonadotrofina en células de Leydig. En el tejido normal la ocupación del primer tipo de sitios de unión para LH (alta afinidad, baja capacidad) sería capaz de disparar la respuesta esteroideogénica. La presencia de los demás sitios (considerados "en exceso") regularía la sensibilidad de la respuesta favoreciendo, quizás, los fenómenos de agregación e interacción con otros componentes de la membrana. Esto estaría mediado por los microfilamentos, lo que explicaría el efecto de la citocalasina B sobre la sensibilidad de la producción de AMPc frente al estímulo hormonal. El estado de desensibilización se produciría, en primera instancia, por dos fenómenos: 1) el desacoplamiento de la AC (127,128) y 2) una rápida internalización de los receptores de alta afinidad, responsables de la respuesta aguda. Posiblemente estos dos mecanismos no sean independientes. Luego

surgirían los demás bloqueos enzimáticos descriptos y la internalización lenta de los demás receptores. Paralelamente, la administración de hCG produciría un incremento de toda la maquinaria celular, especialmente de aquellos componentes relacionados con la esteroidogénesis. Una segunda dosis acentuaría este efecto trófico de las gonadotrofinas, sin ser capaz ya de volver a desensibilizar las células. Este estado de hipertrofia celular permitiría que, pese a la casi total ausencia de receptores y la escasa producción de AMPc, una nueva exposición a la LH pueda estimular la síntesis de testosterona.

Hablar de una hipertrofia celular implica mencionar incrementos en la síntesis de proteínas. Ya en 1976 se sugirió que las gonadotrofinas eran capaces de producir una activación de la cromatina testicular (233). Sin embargo ese trabajo se realizó sobre el testículo total y hasta la observación de Aquilano y Dufau (201) sobre la activación por hCG de la ARN polimerasa de células de Leydig no se había informado sobre ninguna actividad enzimática nuclear que fuese modulada por gonadotrofinas.

La actividad de topoisomerasa I no había sido descripta aún en células de Leydig por lo que en primera instancia se la caracterizó. Se demostró luego que los tratamientos con gonadotrofinas tanto "in vivo" como "in vitro" no modifican la actividad de topoisomerasa I. Sin embargo, una dosis desensibilizante de hCG es capaz de aumentar la actividad específica de la enzima de células de Leydig entre las 12 y las 48 horas después de la inyección. Es interesante notar que otros autores (201) encontraron que dosis desensibilizantes de hCG producían una estimulación prolongada de las actividades de ARN polimerasa de células de Leydig. El perfil temporal para esta activación resultó ser prácticamente idéntico al de la topoisomerasa I. Ambas enzimas podrían estar afectando los procesos de transcripción que desembocan en la hipertrofia celular. Hodgson y de Kretser también demostraron que la hipertrofia se manifiesta a partir justamente de las doce horas y se mantiene por lo menos hasta las 48 horas después de la inyección de hCG (229).

Cuando se profundizó en el mecanismo de la estimulación de la actividad de la topoisomerasa I por gonadotrofinas se vió que, en células de Leydig, existe una

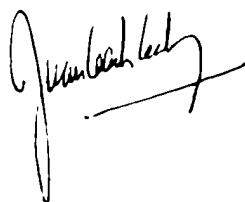
compartimentalización de la enzima. Se detectó una actividad fuertemente unida a la cromatina, sólo extraíble con NaCl 1 M, que no fue afectada por ninguno de los tratamientos hormonales probados. El resto de las actividades medidas fueron moduladas por la gonadotrofina en una secuencia temporal. A partir de las cuatro horas se observa un incremento pequeño pero significativo de la actividad citosólica que entre las 24 y 48 horas desciende a valores menores que los basales. Coincidentemente, la actividad nuclear extraíble con NaCl 0,5 M está estimulada entre las 24 y las 48 horas posteriores a la inyección de hCG. Estos resultados sugieren que existe una actividad latente de topoisomerasa I en el citosol que sufre un proceso de activación y traslocación hacia el núcleo, inducido por la gonadotrofina.

En cuanto al mecanismo de activación en sí, se demostró que en extractos totales de células controles el AMPc aumenta considerablemente la actividad de topoisomerasa I. Varios fenómenos nucleares parecen estar regulados por este nucleótido. El AMPc ha sido relacionado con el control de la expresión de genes específicos (149-153). Varios grupos han sugerido que alguno o quizás

todos los pasos de la producción de ARNm están regulados por mecanismos de fosfo - desfosforilación dependientes de AMPc (156-159). Por otro lado, existen factores proteicos como las HMG 14/17 capaces de modular la actividad de topoisomerasa I y de ser fosforilados por cascadas de quinasas dependientes de AMPc (234). Además, es interesante destacar que la topoisomerasa I de hepatoma ha sido encontrada fosforilada en serina (235) y, por otra parte, la fosforilación de la topoisomerasa I en serina estimula la actividad enzimática (236). Recientemente Tse Dinh y col. (237) demostraron que la topoisomerasa I es inhibida por fosforilación "in vitro" en tirosina. Los resultados presentados aquí demuestran que la estimulación con AMPc es mediada por fenómenos de fosforilación. La compartimentalización funcional del AMPc (30,126), la PK (29) y la topoisomerasa I podrían explicar los diferentes tiempos necesarios para la activación de la topoisomerasa I por la gonadotrofina y el AMPc. Pese a esta diferencia, el hecho que sólo se haya agregado AMPc garantiza la homología del sistema y permite sugerir un mecanismo mediado por AMPc para la activación de la enzima por la hormona.

Recientemente se ha informado que la forma fosforilada de la subunidad regulatoria de la PK del tipo II dependiente de AMPc (RII) posee una actividad intrínseca de topoisomerasa I (238). Este hallazgo, sumado a la demostración de una traslocación de RII al núcleo de hepatocitos (158), permite una interpretación global de los resultados aquí presentados. La hipótesis sería que la LH induce un aumento del nivel de AMPc que al activar a la PK produce dos efectos. Por un lado, se produce la fosforilación de proteínas, entre ellas RII. Por el otro, esta subunidad, ahora con actividad de topoisomerasa I, se traslocaría al núcleo donde intervendría en la transcripción de genes específicos. Esto explicaría también porque el AMPc no es capaz de estimular la enzima en un extracto nuclear.

Existen, por supuesto, otras posibilidades: la PK podría estar fosforilando otros factores que, a su vez, modifican la actividad enzimática; o la misma enzima podría ser sustrato de la PK. De todos modos, estos resultados presentan un modelo interesante para la explicación de los efectos nucleares de hormonas proteicas que utilizan al AMPc como segundo mensajero.



REFERENCIAS

- 1 . Langley JN (1906) Proc.Roy.Soc.Ser.B.Biol.Sci., 78:170.
- 2 . Ehrlich P (1908) Conferencia Nobel.
- 3 . Clark AJ (1926) J.Physiol. (Londres), 61:530.
- 4 . Clark AJ (1926) J.Physiol. (Londres), 61:547.
- 5 . Haynes RC, Sutherland E, Rall TW (1960) Rec.Prog. Horm.Res., 16:121.
- 6 . Sutherland E, Oye I, Butcher RW (1965) Rec.Prog. Horm.Res., 21:623.
- 7 . De Kretser DM, Catt KJ, Burger HG, Smith GC (1969) J.Endocrinol., 43:105.
- 8 . Castro AE, Alonso A, Mancini RE (1972) J.Endocrinol., 52:129.
- 9 . De Kretser DM, Catt KJ, Dufau ML, Hudson B (1971) J.Reprod. and Fertil., 24:311.
- 10 . De Kretser DM, Catt KJ, Paulsen CA (1971) Endocrinology, 88:332.
- 11 . Christensen AK, Mason NR (1965) Endocrinology, 76:646.
- 12 . Hall PF, Irby DC, de Kretser DM (1969) Endocrinology, 84:488.
- 13 . Catt KJ, Tsuruhara T, Dufau ML (1972) Biochim. Biophys.Acta 279:194.
- 14 . Dufau ML, Catt KJ (1973) Nature New Biol., 242:246.
- 15 . Dufau ML, Charreau EH, Catt KJ (1973) J.Biol.Chem., 248:6973.

- 16 . Dufau ML, Rvan D, Baukal A, Catt KJ (1975) J.Biol.Chem.. 250:4822.
- 17 . Rebois RV, Onisdeo-Sale F, Brady RO, Fishman PH (1981) Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 78:2086.
- 18 . Ambry M, Colen R, Ducharme JR, Crine P (1982) Endocrinology, 111:2129.
- 19 . Conn MP, Tsuruhara T, Dufau ML, Catt KJ (1977) Endocrinology, 101:639.
- 20 . Hsueh AJW, Dufau ML, Katz SI, Catt KJ (1976) Nature 261:710.
- 21 . Deheilia A, Nozu K, Dufau ML, Catt KJ (1982) J.Biol.Chem. 257:13781.
- 22 . Catt KJ, Tsuruhara T, Mendelson C, Ketelslegers JM, Dufau ML (1974) en "Hormone binding and target cell activation in the testis", Plenum Press, New York.
- 23 . Dufau ML, Catt KJ, Tsuruhara T (1971) Biochim. Biophys. Acta. 252:574.
- 24 . Murad F, Strauch BS, Vaughan M (1969) Biochim. Biophys. Acta, 177:591.
- 25 . Kuehl FA, Pantelli DJ, Tarnoff J, Humes JL (1970) Biol. Reprod.. 2:154.
- 26 . Dufau ML, Watanabe K, Catt KJ (1973) Endocrinology, 92:6.
- 27 . Sandler R, Hall PF (1966) Endocrinology, 79:647.
- 28 . Mendelson C, Dufau ML, Catt KJ (1975) J.Biol.Chem.. 250:8818.
- 29 . Dufau ML, Tsuruhara T, Horner K, Podestá E, Catt KJ (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:3419.
- 30 . Dufau ML, Horner K, Hayashi K, Tsuruhara T, Conn MP, Catt KJ (1978) J.Biol.Chem., 253:3721.
- 31 . Lefevre A, Finaz C, Berthelon MC, Saez JM (1985) Mol. Cell. Endocrinol., 40:107.

- 32 . Podestá E, Solano A, Molina y Vedia L, Paladini A, Sánchez M, Torres HN (1984) Eur. J. Biochem., 145:329.
- 33 . Williams C, Catt KJ (1976) FEBS Letters, 69:186.
- 34 . Huhtaniemi IT, Nozu K, Warren DW, Dufau ML, Catt KJ (1982) Endocrinology, 111:1711.
- 35 . Ivenqar R, Birnbaumer L (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:5179.
- 36 . Northup JK, Smigel MD, Sternneis PC, Gilman AG (1983) J.Biol.Chem., 258:11369.
- 37 . Rodbell M (1980) Nature, 284:17.
- 38 . Arad H, Rosenbusch JP, Levitzki A (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6579.
- 39 . Dufau ML, Baükal A, Catt KJ (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5873.
- 40 . Verghese MW, Smith CD, Snyderman F (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun., 127:450.
- 41 . Dawson AP (1985) FEBS Letters, 185:147.
- 42 . Sullivan MHF, Cooke BA (1985) Mol. Cell. Endocrinol., 34:17.
- 43 . Lin T (1985) Endocrinology, 117:119.
- 44 . Gill GN, Garren LD (1970) Biochem. Biophys. Res. Commun., 39:335.
- 45 . Menon KMJ (1973) J.Biol.Chem., 248:494.
- 46 . Cooke BA, van der Kemp (1976) Biochem.J., 154:371.
- 47 . Podestá E, Dufau ML, Catt KJ (1978) Biochem., 17:1566.
- 48 . Podestá E, Dufau ML, Solano A, Catt KJ (1978) J.Biol.Chem., 253:8994.
- 49 . Winters C (1982) Endocrinology, 110:256.

- 50 . Winters C, Dufau ML (1984) FEBS Letters. 178:73.
- 51 . Dufau ML, Sorrell SH, Catt KJ (1981) FEBS Letters, 131:229.
- 52 . Cooke BA, Lindh L, Janszen FH, van Driel MJ, Bakker CP, van der Planck MP, van der Molen HJ (1979) Biochim. Biophys. Acta, 583:320.
- 53 . Gonzalez-Martinez A, Benhamed M, Bommelaer MC, Haour F, Saez JM, Dazord A (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun.. 105:334.
- 54 . Rommerts FFG, Bakker GH, van der Molen HJ (1984) J. Steroid Biochem., 19:367.
- 55 . Bakker GH, Hooqerbrugge JW, Rommerts FFG, van der Molen HJ (1981) Biochem. J., 198:339.
- 56 . Bakker GH, Hooqerbrugge JW, Rommerts FFG, van der Molen HJ (1982) Biochem. J., 204:809.
- 57 . Bakker GH, Hooqerbrugge JW, Rommerts FFG, van der Molen HJ (1983) FEBS Letters, 161:33.
- 58 . Dazord A, Genot A, Langlois-Gallet D, Mombrial C, Haour F, Saez JM (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun.. 118:8.
- 59 . Shin S, Sato GH (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun., 45:501.
- 60 . Cooke BA, Janszen FH, van der Molen HJ (1975) Acta Endocr.. 199:104.
- 61 . Mendelson C, Dufau ML, Catt KJ (1975) Biochim. Biophys. Acta, 411:222.
- 62 . Cooke BA, Janszen FH, Clotscher WF, van der Molen HJ (1975) Biochem. J., 150:413.
- 63 . Janszen FH, Cooke BA, van der Molen HJ (1977) Biochem. J., 162:341.
- 64 . Janszen FH, Cooke BA, van Driel MJ, van der Molen HJ (1976) FEBS Letters, 71:269.

- 65 . Melner MH, Puett D (1985) Biochem. International.
10:763.
- 66 . Bakker GH, Hooqerbrugge JW, Rommerts FFG, van der Molen
HJ (1985) J. Steroid Biochem.. 22:311.
- 67 . Josefsberg Z, Posner BI, Patel B, Bergeron JJ (1979)
J.Biol.Chem. 254:209.
- 68 . Kurokawa K, Lerner RL (1980) Endocrinology 106:655.
- 69 . Carpenter G, Cohen S (1976) J. Cell Biol., 71:159.
- 70 . Heldin CH, Westermark B, Wasteson A (1979) Nature,
282:419.
- 71 . Marshall S, Olefsky JW (1980) J. Clin. Invest.,
66:763.
- 72 . Shechter Y, Schlessinger J, Jacobs S, Chang KJ,
Cuatrecasas P (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
75:2135.
- 73 . Levi A, Shechter Y, Neufeld EJ, Schlessinger J (1980)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:3469.
- 74 . Hazum E, Cuatrecasas P, Marian J, Conn PM (1980) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 77:6692.
- 75 . Haidler HT, Ash JF, Singer SJ, Cohen S (1978) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 75:3317.
- 76 . Amsterdam A, Berkowitz A, Nimrod A, Kohen F (1980) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 77:3440.
- 77 . Jarrett L, Smith RM (1977) J. Supramol. Struct., 6:45.
- 78 . Khan CR, Baird KL, Jarrett DB, Flier JS (1978) Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, 75:4209.
- 79 . Jacobs S, Chang KJ, Cuatrecasas P (1978) Science,
200:1283.
- 80 . Podestá E, Solano A, Attar R, Sanchez M, Molina y Vedia
L (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:3986.

- 81 . Livingston JN, Purvis BJ (1980) Am. J. Physiol., 238:267.
- 82 . Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS (1979) Nature, 279:679.
- 83 . Anderson RGW, Goldstein JL, Brown MS (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:2434.
- 84 . Helenius A, Mellman I, Wall D, Hubbard A (1983) Trends Biochem. Sci., 8:245.
- 85 . Heuser J, Evans L (1980) J. Cell Biol., 84:560.
- 86 . Pastan I, Willingham MC (1983) Trends Biochem. Sci., 8:250.
- 87 . Gorden P, Carpentier JL, Cohen S, Orci L (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:5025.
- 88 . Amsterdam A, Nimrod A, Lamprecht SA, Burstein Y, Lindner HR (1979) Am. J. Physiol., 5:129.
- 89 . Terris S, Hofmann C, Steiner DF (1979) Can. J. Biochem., 57:459.
- 90 . Marshall S, Olefsky JM (1979) J. Biol. Chem., 254:10143.
- 91 . Shiu RPC (1980) J. Biol. Chem., 255:4278.
- 92 . Josefsberg Z, Posner BI, Patel B, Bergeron JJM (1979) J. Biol. Chem., 254:209.
- 93 . Posner BI, Patel B, Verma AK, Bergeron JJM (1980) J. Biol. Chem., 255:735.
- 94 . Posner BI, Patel B, Khan MN, Bergeron JJM (1982) J. Biol. Chem., 257:5789.
- 95 . Saermark T, Flint N, Evans WH (1985) Biochem. J., 225:51.
- 96 . Brown MS, Anderson RGW, Goldstein JL (1983) Cell, 32:663.

- 97 . Marshall S, Olefsky JM (1983) J. Cell. Physiol., 117:195.
- 98 . Lvall RM, Pastan I, Willingham MC (1985) J. Cell. Physiol., 122:166.
- 99 . Hsueh AJ, Dufau ML, Catt KJ (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., 72:1145.
100. Haour F, Saez JM (1977) Mol. Cell. Endocrinol., 7:17.
101. Purvis K, Torjesen PA, Haug E, Hansson V (1977) Mol. Cell. Endocrinol., 8:73.
102. Hsueh AJ, Dufau ML, Catt KJ (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:592.
103. Chen YD, Payne AH (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun., 74:1589.
104. Powell M, Rajan V, Cohen J, Bhalla V (1981) Biol. Reprod., 25:708.
105. Barañao JL, Dufau ML (1983) J. Biol. Chem., 258:7322.
106. Lloyd CE, Ascoli M (1983) J. Cell Biol., 96:521.
107. Schwall RH, Erickson GF (1984) Endocrinology, 114:1114.
108. Ascoli M, Fuett D (1977) FEBS Letters, 75:77.
109. Huhtaniemi I, Rajaniemi H, Martikainen H, Tikkala L (1978) Int. J. Androl., Sup. 2:1.
110. Ascoli M, Fuett D (1978) J. Biol. Chem., 253:4892.
111. Ascoli M, Fuett D (1978) J. Biol. Chem., 253:7832.
112. Ascoli M (1982) J. Biol. Chem., 257:13306.
113. Tsuruhara T, Dufau ML, Cigorra S, Catt KJ (1977) J. Biol. Chem., 252:9002.
114. Saez JM, Haour F, Tell GP, Gallet D, Sanchez P (1978) Molec. Pharmacol., 14:1054.

115. Ascoli M (1978) J. Biol. Chem., 253:7839.
116. Cidorrada S, Dufau ML, Catt KJ (1978) J. Biol. Chem., 253:4297.
117. Charreau EH, Calvo JC, Nozu K, Pignataro OP, Catt KJ, Dufau ML (1981) J. Biol. Chem., 256:12719.
118. Nozu K, Matsuura S, Catt KJ, Dufau ML (1981) J. Biol. Chem., 256:10012.
119. Nozu K, Dufau ML, Catt KJ (1981) J. Biol. Chem., 256:1915.
120. Nozu K, Dehejia A, Zawistowich L, Catt KJ, Dufau ML (1982) A. N.Y. Acad. Sci., 383:212.
121. Nozu K, Dehejia A, Zawistowich L, Catt KJ, Dufau ML (1981) J. Biol. Chem., 256:12875.
122. Van Beqqik L, Groen LJ, van der Veen E, de Vries CP (1985) Int. J. Androl., 8:28.
123. Quinn PG, Payne AH (1985) J. Biol. Chem., 260:2092.
124. Jahnsen T, Purvis K, Torjesen PA, Hansson V (1981) Arch. Androl., 6:155.
125. Zor U, Shentzer P, Azrad A, Sairman MR, Amsterdam A (1984) Endocrinology, 114:2143.
126. Guillou F, Martinat N, Combarnous Y (1985) FEBS Letters, 184:6.
127. Dix CJ, Schumacher M, Cooke BA (1982) Biochem. J., 202:739.
128. Schumacher M, Schwarz M, Brandle W (1984) Mol. Cell. Endocrinol., 34:67.
129. Rapaport B, Adams RJ (1976) J. Biol. Chem., 251:6653.
130. Insel PA, Koachman AM (1982) J. Biol. Chem., 257:9717.
131. Strulovici B, Weinstein Y, Zor U (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun., 103:638.

132. Iyengar R, Birnbaumer L (1981) Adv. Cyclic Nucleotide Res., 14:93.
133. Kurokawa T, Kurokawa M, Ishibashi A (1979) Biochim. Biophys. Acta. 583:467.
134. Simantov R, Shkolnik T, Sachs L (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4798.
135. Christensen AK, Peacock KC (1980) Biol. Reprod., 22:383.
136. Rivarola MA, Bergadá C, Cullen M (1970) J. Clin. Endocrinol. Metab., 31:526.
137. D'Aquila R, Vicari E, Aliffi A, Mauqeri G, Mongioi A, Gulizia S (1982) J. Clin. Endocrinol. Metab., 55:76.
138. Payne AH, Wong KL, Vega MM (1980) J. Biol. Chem., 255:7118.
139. Risbridger GP, Robertson DM, de Kretser DM (1982) Endocrinology, 110:138.
140. Calvo JC (1979) Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
141. Conn PM, Tsuruhara T, Dufau ML, Catt KJ (1977) Endocrinology, 101:639.
142. Payne AH, Downing JR, Wong KL (1980) Endocrinology, 106:1424.
143. Dehejia A, Nozu K, Catt KJ, Dufau ML (1982) J. Biol. Chem., 257:13781.
144. Cooke BA, Magee-Brown R, Golding M, Dix CJ (1981) Int. J. Androl., 4:355.
145. O'Shaughnessy PJ, Wong K, Payne AH (1981) Endocrinology, 109:1061.
146. Chase DJ, Payne AH (1983) Endocrinology, 112:29.
147. O'Shaughnessy PJ, Payne AH (1982) J. Biol. Chem., 257:11503.

148. Georgiu M, Favne AH (1985) *Endocrinology*, 117:1184.
149. Maurer RA (1981) *Nature*, 294:94.
150. Murdoch GH, Rosenfeld MG, Evans RM (1982) *Science*, 218:1313.
151. Lamers WH, Hanson RW, Meissner HM (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5137.
152. Jungmann RA, Kelley D, Miles MF, Milkowski DM (1983) *J. Biol. Chem.*, 258:5312.
153. Lewis EJ, Tank AW, Weiner N, Chikaraishi DM (1983) *J. Biol. Chem.*, 258:14632.
154. Boney C, Fink D, Schlichter D, Carr K, Wicks D (1983) *J. Biol. Chem.*, 258:4917.
155. Langan TA (1969) *J. Biol. Chem.*, 244:5763.
156. Jonson EM (1977) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 8:267.
157. Matthews HR, Huebner VD (1984) *Mol. Cell. Biochem.*, 59:81.
158. Kuettel MR, Squinto SR, Kwastwelfeld J, Schwoch G, Schweppe JS, Jungmann RA (1985) *J. Cell Biol.*, 101:965.
159. Niig EA, Schafer G, Hilz H, Eppenberger NM (1985) *Cell*, 41:1039.
160. Weisbrod S (1982) *Nature*, 297:289.
161. Szopa J, Jacob G, Arfmann H (1980) *Biochem.*, 19:987.
162. Waterman M, Murdoch GH, Evans RM, Rosenfeld MG (1985) *Science*, 229:267.
163. Nagamine Y, Reich E (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4606.
164. Kondrashin AA (1985) *Trends Biochem. Sci.*, 10:97.
165. Nesterova MV, Glukhov AI, Severin ES (1982) *Mol. Cell. Biochem.*, 49:53.

166. Weber IT, Takio K, Titani K, Steitz TA (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:7679.
167. Takio T, Smith SB, Krebs EG, Walsh KA, Titani K (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:2544.
168. Wang JC (1971) J. Mol. Biol., 55:523.
169. Champoux JJ, Dulbecco R (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:143.
170. Baase WA, Wang JC (1974) Biochem., 13:4299.
171. Mattoccia E, Attardi DG, Tocchini GP (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:4551.
172. Vosberg HP, Grossman LI, Vinograd J (1977) Eur. J. Biochem., 55:79.
173. De Leys RJ, Jackson DA (1976) Nucleic Acid Res., 3:641.
174. Eskin B, Morgan AR (1978) Can. J. Biochem., 56:89.
175. Champoux JJ, Mc Conaughy BL (1976) Biochem., 15:4638.
176. Keller W (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:4876.
177. Vosberg HP, Grossman LI, Vinograd J (1977) Eur. J. Biochem., 55:79.
178. Goto T, Laipis P, Wang JC (1984) J. Biol. Chem., 259:10422.
179. Fairfield F, Bauer WR, Simpson M (1979) J. Biol. Chem., 254:9352.
180. Maaloe O, Kjeldgaard NO (1966) En: "Control of macromolecular synthesis", NY, Benjamin Press.
181. Bauer WR, Ressler EC, Kates J, Patzke J (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:1841.
182. Higashinakagawa T, Wahn H, Reeder RH (1977) Dev. Biol., 55:375.
183. Bonven B, Westergaard O (1982) Nucleic Acids Res., 10:7593.

184. Gocke E, Bonven B, Westerqaard O (1983) Nucleic Acids Res., 11:7661.
185. Wu C (1980) Nature, 286:854.
186. Weintraub H (1983) Cell, 32:1191.
187. Elgin SCR (1984) Nature, 309:213.
188. Di Nardo S, Voelkel K, Sternglanz R (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2616.
189. Vemura T, Yanqidh M (1984) EMBO J., 3:1737.
190. Luchnik AN, Bakayev VV, Zbarsky I, Georgiev G (1982) EMBO J., 1:1353.
191. Boyle W (1968) Transplantation, 6:761.
192. Wiebe JP (1976) Endocrinology, 98:505.
193. Thorell JJ, Johansson BG (1971) Biochim. Biophys. Acta, 251:363.
194. Scatchard G (1949) Ann. NY Acad. Sci., 51:660.
195. Cressie NAC, Keightley DD (1979) J. Steroid Biochem., 11:1173.
196. Calvo JC (1982) Comunicación personal.
197. Segaloff DL, Ascoli MF (1981) J. Biol. Chem., 256:11420.
198. Tesone M, Biella de Souza Valle L, Foglia V, Charreau EH (1976) Acta Physiol. Latinoam., 26:387.
199. Abraham GE, Swerdloff R, Tulchinsky D, Odell WD (1971) J. Clin. Endocrinol. Metab., 32:619.
200. Nieshlag DL, Loriaux DL, Lipsett MB (1972) Steroids, 19:669.
201. Aquilano DR, Dufau ML (1983) Endocrinology, 113:94.
202. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J en: "Molecular cloning: a laboratory manual.", Cold Spring Harbor, NY.

203. Martin SR, Mc Cowbrey WK, Mc Conaughy BL, Young LS, Benn MD, Brewer BJ, Champoux JJ (1983) Meth. in Enzimol., 100:137.
204. Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) J. Biol. Chem., 93:265.
205. Bradford MM (1976) Anal. Biochem., 72:248.
206. Cresto JC, Udrisar DP, Camberos MC, Basabe JC, Gomez-Acuña P, de Majo SF (1981) Acta Physiol. Latinoam., 31:13.
207. Benveniste R, Frohman LA, Rabinowitz D (1975) Endocrinology, 97:20.
208. Van Orden DE (1972) Proc. Soc. Exp. Biol., 139:267.
209. Radicella JP, Calvo JC, Charreau EH (1985) J. Receptor Res., 5:349.
210. Catt KJ, Tsuruhara T, Mendelson C, Keteslegers J, Dufau ML (1974) en "Hormone binding and cell activation of the testis" Plenum Press, NY.
211. Moyle W, Netburn N, Gosgrove A, Krieger J, Bahl O (1980) Am. J. Physiol., 238:E293.
212. Rodbard D, Munson PJ, Thakur AK (1980) Cancer, 46:2907.
213. Keteslegers J, Knott GD, Catt KJ (1975) Biochem. 14:3075.
214. Danforth DR, Stouffer RL (1985) Endocrinology, 117:747.
215. Danforth DR, Wells MA, Stouffer RL (1985) Endocrinology, 117:755.
216. Mombrial F, Begeot M, Leduque P, Dubois P, Saez J, Haour F (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun., 118:206.
217. Kinnunen R, Kalilainen M, Rajaniemi H (1981) J. Histochem. Cytochem., 29:9.
218. Huhtaniemi JT, Ketikinemi M, Catt KJ (1981) Endocrinology, 109:588.

219. Ahmed CE, Sawyer H, Niswender GD (1981) *Endocrinology*, 109:1380.
220. Warren R, Doyle D (1981) *J. Biol. Chem.*, 256:1346.
221. Robinson MS, Rhodes JA, Albertini DF (1983) *J. Cell. Physiol.*, 117:43.
222. Bretscher MS, Thomson J, Pearse BMF (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4156.
223. Posner B, Khan M, Bergeron JJ (1982) *Endocrine Rev.*, 3:280.
224. Laws AO, Kerr J, de Kretser DM (1984) *Mol. Cell. Endocrinol.*, 38:39.
225. Zor U, Strulovici B, Lindner HR (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80:983.
226. Zor U (1983) *Endocrine Rev.*, 4:1.
227. Hall PF, Charponnier C, Nakamura M, Gabbiani G (1979) *J. Steroid Biochem.*, 11:1361.
228. Brown BL, Albano JDM, Ekins RP, Sgherzi AM (1971) *Biochem. J.*, 121:561.
229. Hodgson Y, de Kretser DM (1984) *Mol. Cell. Endocrinol.*, 35:75.
230. Aquilano D, Dufau ML (1984) *Endocrinology*, 114:499.
231. Laws HO, Wreford NGM, de Kretser DM (1985) *Mol. Cell. Endocrinol.*, 42:73.
232. Ewing L, Zirkin B (1983) *Recent Prog. Horm. Res.*, 39:599.
233. Chiu J, Thomson J, Hnilica LS (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, 435:1.
234. Cooper E, Spaulding SW (1985) *Mol. Cell. Endocrinol.*, 39:1.
235. Durban E, Roll D, Beckner G, Busch H (1983) *Cancer Res.*, 41:537.

- 236. Durban E, Milles J, Roll D, Busch H (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun., 111:894.
- 237. Tse Dinh YZ, Wong TW, Goldberg AR (1984) Nature. 312:785.
- 238. Constantinou A, Squinto SP, Jungmann RA (1985) Cell, 42:429.

RESUMEN

En esta tesis se estudiaron algunos aspectos del mecanismo de acción de la hormona luteinizante en las células de Leydig de la rata. Esta hormona proteica produce en el tejido testicular dos tipos de efectos: uno agudo, que se manifiesta por una rápida estimulación de la síntesis y secreción de testosterona y otro tardío, de tipo trófico. Esta dualidad en la respuesta hace que este sistema sea un modelo interesante para el estudio del mecanismo de acción de hormonas que actúan a nivel de receptores de membrana y que utilizan como segundo mensajero al AMPc.

Los resultados de esta tesis se han dividido en cinco secciones diferentes. Si bien cada una de ellas puede analizarse por separado, existe un encadenamiento entre estas distintas partes. En primera instancia se desarrolla con detalle un método para la medición de la actividad específica de hormonas o lípidos marcados radiactivamente, herramienta indispensable para el estudio de la interacción hormona - receptor. Para ello se utilizó como base el método de autodesplazamiento, que fue ampliado, perfeccionado y comprobado experimentalmente. Luego se pasó al estudio de la reacción entre la LH y su receptor testicular. Se encontró que, en las condiciones experimentales adecuadas, es posible detectar dos

tipos de sitios de unión para LH. lo que aun no habia sido descripto. Se calcularon las constantes de disociación, las de afinidad y la energía de activación de la reacción.

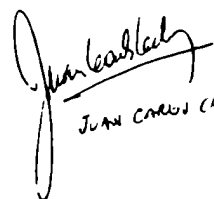
Se estudió luego el proceso de internalización del complejo hormona - receptor por el cual la hormona inicialmente unida a la membrana celular es endocitada y finalmente degradada. Para ello se analizaron las cinéticas de internalización y degradación y el papel del citoesqueleto y los lisosomas en estos procesos. Se vio que la degradación de la hormona es inhibida por la cloroquina y el cloruro de amonio, ambos agentes lisosomotrópicos, que no afectan, en las concentraciones usadas, la respuesta esteroideogénica. La colchicina, en cambio, inhibe fuertemente la internalización en si, quedando la hormona sobre la superficie celular. Esto demuestra la intervención de los microtubulos en la endocitosis pero no en la activación de la adenilato ciclasa ni de algún otro paso de la síntesis de testosterona. En cambio, los microfilamentos estarían involucrados en esas etapas, fundamentalmente en la producción de AMPc, ya que la citocalasina B disminuye marcadamente la sensibilidad de la estimulación por LH de la producción del nucleótido. La

La desaparición, inducida por la hormona, de los sitios receptores de membrana en estas células es mucho más lenta que la descripta para otros modelos. Esto permitió el estudio de la

relación entre el número de receptores y la respuesta esteroideogénica. Para ello se aprovechó el modelo de la resensibilización, en que las células son capaces de responder a la gonadotropina en condiciones en que los receptores son casi nulos y no se detecta aumento en la producción de AMPc. Primero se descartó que esto no fuera el resultado de un efecto selectivo de la administración de hCG sobre alguna población de células de Leydig en especial. Luego se demostró que existe una producción de AMPc inducida por la hormona, que pese a ser muy pequeña permite el disparo de la estimulación esteroideogénica igual o mayor que la normal. Esto apoyaría la teoría de que la gonadotropina produce un crecimiento de la maquinaria esteroideogénica, que acompaña a la hipertrofia celular demostrada por otros autores.

Para que existan efectos tróficos como los mencionados la hormona debe producir algún tipo de modificación a nivel nuclear. Se eligió como posible blanco de esta acción nuclear a la topoisomerasa I, una enzima que parece estar asociada a la transcripción. La actividad de topoisomerasa I es incrementada por acción de la gonadotropina. Este efecto recién se detecta a partir de las 12 horas después del tratamiento. Se estudió finalmente el mecanismo de esta estimulación, encontrándose que el AMPc y una cascada de fosforilación modulan la actividad en extractos totales "in vitro". Esto permite postular a la

topoisomerasa I como un blanco nuclear de hormonas cuya acción es mediada por AMFc.


Juan Carlos Corvo